

Molekulare Grundlagen der Wirkung von Puromycin und dessen Bedeutung in der Biochemie

von

STEFAN FRANK

aus Stuttgart



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543101_0008

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Universität Erlangen-Nürnberg
Vorstand: Prof. Dr. W. Kersten

MOLEKULARE GRUNDLAGEN DER WIRKUNG VON PUROMYCIN
UND DESSEN BEDEUTUNG IN DER BIOCHEMIE

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Stefan Frank
aus
Stuttgart

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der
Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. L. Demling

Referent: Prof. Dr. W. Kersten

Tag der mündlichen Prüfung: 13. August 1974

INHALT

Einleitung	5
Vorbemerkung	8
Proteinbiosynthese	9
Allgemeines	9
Translation	21
Puromycin: Entdeckung, Struktur	37
Erste Schritte zur Aufklärung der Wirkung	41
Wirkungsspektrum	43
Wachstumshemmung	44
Hemmung der Synthese von Makromolekülen	46
Wirkung auf den Nukleotidstoffwechsel	47
Wirkungsmechanismus und dessen Aufklärung	50
Wirkung auf Polysomen	78
Puromycin als Werkzeug	90
Proteinsynthese	91
Antibiotika	103
Gedächtnis	110
Enzyme	111
Glykoproteine	113
Virologie	114
Hormone	117
Blut	119
Zusammenfassung	120
Literatur	122
Lebenslauf	133

EINLEITUNG

Der Grund, die Wirkung von Antibiotika zu untersuchen, war hauptsächlich der, ihre Wirkung auf die Erreger von Krankheiten zu sehen. Versuche in vivo waren zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus aber nicht ausreichend, da die Zellen, Organe oder Organismen viel zu komplexe Testsysteme darstellen. Es ist kaum möglich, die unzähligen Störungseinflüsse vieler bekannter und unbekannter Faktoren abzuschätzen und richtig zu berücksichtigen. Zum besseren Verständnis sind daher Ergebnisse von Versuchen in Zellkulturen oder in vitro-Systemen aus verschiedenen Organismen nötig. Kennt man erst die Wirkungsweise und die wirksamen Bestandteile eines Antibiotikums, lassen sich dann eventuell gezielt Versuche machen, die therapeutische Wirkung zu erhöhen, oder eventuelle Nebenwirkungen bei einer medizinischen Anwendung beim Menschen vermeiden.

Für die Biochemie werden diese Stoffe interessant, wenn man sie als hochspezifische Inhibitoren zur Erforschung komplexer biochemischer Prozesse einsetzen kann. Je nach Angriffsort hemmen sie die Synthese von Zellwandbausteinen, die Synthese von Nukleinsäuren und Proteinen, die biologische Oxidation, den Ionentransport durch Membranen oder bestimmte Stoffwechselwege. Durch gezielten Einsatz eines oder mehrerer Antibiotika, mit oder nacheinander, ist es möglich, Stoffwechselwege in einzelnen Phasen zu blockieren, und dann Zwischenprodukte, die normalerweise in Bruchteilen von Sekunden wieder verschwinden, festzuhalten, anzureichern und zu analysieren.

Der Name Antibiotikum wurde von WAKSMAN et al. 1941 den Stoffen gegeben, die von Mikroorganismen gebildet werden, und auf andere Mikroorganismen hemmend wirken. Solche Stoffe bilden die chemischen Waffen im Kampfe ums Dasein zwischen den Mikroorganismen. Ihre Existenz vermutete man schon vor fast hundert Jahren.

1877 fanden PASTEUR und JOUBERT, daß manche Mikroorganismen das Wachstum von *Bacillus anthracis* verhindern können. Zwei Jahre später prägte De BARY für diese gegenseitige Behinderung von Mikroorganismen den Begriff Antibiose als Gegensatz zu dem der Symbiose. 1889 beschrieb FREUDENREICH die Hemmung des Wachstums von Typhus- und Cholerabazillen durch *Pseudomonas aeruginosa*. Die aktive Substanz dabei konnte 1899 von EMMERICH und LOEW isoliert werden, und erhielt den Namen Pyocyanase nach dem alten Namen *Pseudomonas pyoceanea*. Dies war das erste Antibiotikum, das isoliert werden konnte. Die ersten Beobachtungen der antibiotischen Wirkung von *Penicillium luteum* wurden 1891 von WEHMER beschrieben.

Nach der Jahrhundertwende wurde eine ganze Anzahl von Antibiosesystemen gefunden. Die Bedeutung dieser Ergebnisse wurde jedoch meist nicht erkannt. Auch das von FLEMING (1929) gefundene Penicillin wäre fast in Vergessenheit geraten, da in den folgenden Jahren die Sulfonamide, deren antibakterielle Wirkung von DOMAGK (1935) erkannt wurde, alle Aufmerksamkeit auf sich zogen. Erst der zweite Weltkrieg mit dem großen Bedarf an Medikamenten, besonders für die Wundversorgung, veranlaßten eine Neuaufnahme der Untersuchungen von Penicillin, die zur Reinigung und ersten therapeutischen Anwendung im Jahr 1941 führte (FLOREY und CHAIN). Der große Aufschwung der Antibiotikaforschung erfolgte erst in dem Jahre nach dem Kriege, als die bis dahin geheim gehaltenen Resultate veröffentlicht wurden. Es folgte die Entdeckung des Streptomycins, Aureomycins, Chloromycetins. In den Jahren um 1950 wurden unzählige Stoffe gefunden, die antibiotische Eigenschaften hatten. Eines davon war das 1952 von PORTER et al. isolierte Puromycin.

Dieses Antibiotikum, das seiner Toxizität wegen therapeutisch nicht eingesetzt werden konnte, erwies sich als einzigartiger Inhibitor der Proteinsynthese und spielte eine zentrale Rolle bei der Erforschung der Mechanismen, die zur Knüpfung der Peptidbindung führen.

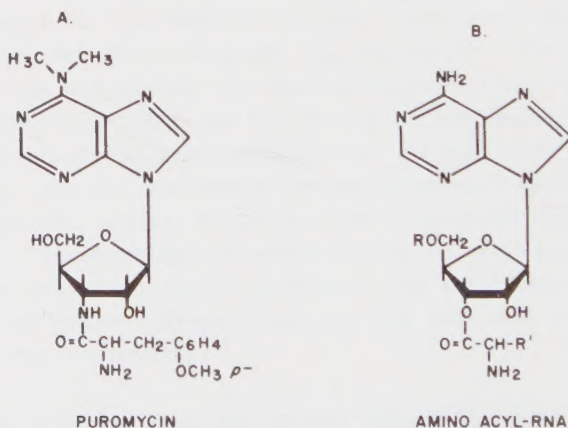
Es soll hier anhand einer Reihe der wichtigsten Versuche gezeigt werden, welchen Einfluß das Puromycin auf unser heutiges Wissen von der Proteinbiosynthese hat.



VORBEMERKUNG

Puromycin ist ein Antibiotikum, das fast nur in der Wissenschaft bekannt ist, da es sich therapeutisch nicht einsetzen läßt. Molekularbiologen jedoch verwenden es häufig, um einzelne Abschnitte der Proteinbiosynthese gezielt nachahmen zu können, da der Wirkungsmechanismus von Puromycin weitgehend bekannt ist. Puromycin gibt ein gutes Beispiel dafür, wie ein Antibiotikum dadurch wirkt, daß es sehr ähnlich wie ein in der Zelle vorkommendes Substrat gebaut ist. Dabei ist es im Allgemeinen so, daß die Strukturanalogen sich mit einem Enzym verbinden können, aber nicht weiter reagieren.

Puromycin hat eine sehr ähnliche Struktur wie das Aminoacylende der Transfer-Ribonucleinsäure. So wird es anstelle einer Aminoacyl-tRNA an das Ribosom gebunden, kann in ein Peptid eingebaut werden, kann die Reaktion aber nicht fortführen. Dadurch hemmt es die Proteinbiosynthese und somit das Zellwachstum sowohl bei Bakterien als auch bei höheren Organismen.



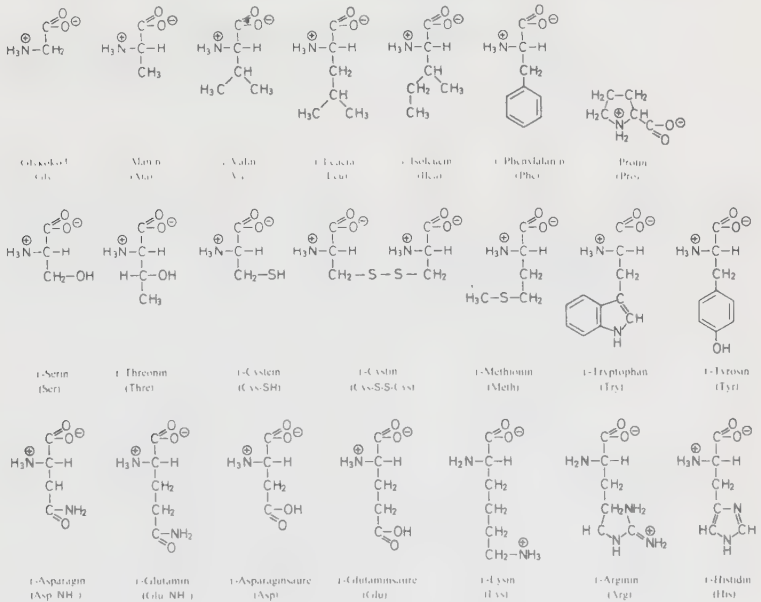
(A) Structure of puromycin. (B) 3'-Terminus of aminoacyl-tRNA. R = tRNA; R' = H; alkyl group of amino acids.

(aus: SUHADOLNIK, S.4)

Proteinbiosynthese

Eine der großen Leistungen der Zelle ist die Synthese von Proteinen. Rein rechnerisch kann man abschätzen, daß es mehr als 20^{100} verschiedene Proteine geben könnten, die von Zellen synthetisiert werden können. Wieviele tatsächlich realisierbar sind und wieviele in vivo gebildet werden, ist unbekannt.

Die Synthese der Proteine verläuft in allen Zellen für alle Proteine nach dem gleichen Prinzip und mit den gleichen Zellbausteinen. Jedes Protein setzt sich aus einer großen Anzahl von Aminosäuren zusammen, deren Sequenz



(aus: GRIMMER, S. 93)

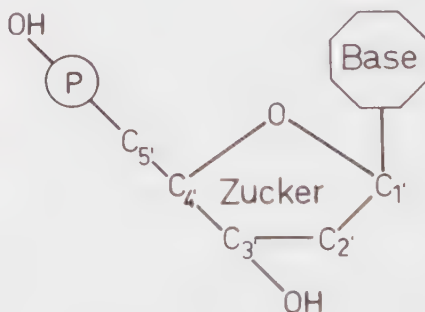
ganz genau eingehalten werden muß, um die geplante Funktion des Proteins zu ermöglichen. Der Mechanismus der Protein-

biosynthese ist heute, zumindest in großen Zügen, weitgehend aufgeklärt. Um später zeigen zu können, wie manche Stoffe in das Geschehen der Proteinsynthese eingreifen, müssen wir hier erst die einzelnen Schritte der Synthese beschreiben.

Zuerst müssen wir fragen, welche Moleküle an der Proteinbiosynthese beteiligt sind. Die Hauptrolle spielen dabei 2 Gruppen von Molekülen: Nukleinsäuren als Desoxyribonukleinsäuren (DNA) und Ribonukleinsäuren (RNA) einerseits und Proteine als Enzyme (DNA- und RNA-Polymerasen) andererseits oder beide gemeinsam in den Ribosomen.

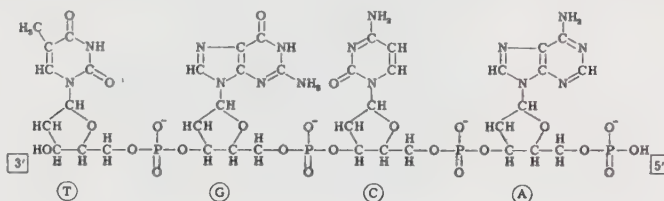
Die Information über die Sequenz der Aminosäuren jedes Proteins liegt in der DNA. Dieses Molekül enthält einen verschlüsselten Bauplan, der angibt, in welcher Reihenfolge die Aminosäuren aneinandergesetzt werden sollen.

DNA-Moleküle sind hochmolekulare Verbindungen, deren Bausteine Nukleotide heißen. Jedes Nukleotid setzt sich zusammen aus einer Base, einem Zucker und einem Phosphatrest.



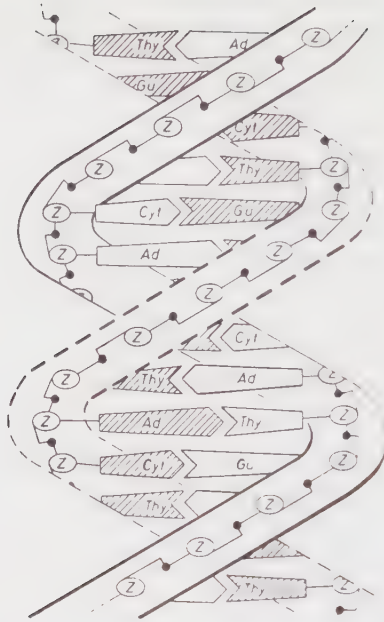
(nach: BRESCH, S. 140)

Als Basen kommen die Purinderivate Adenin (A) und Guanin (G) und die Pyrimidinderivate Cytosin (C) und Thymin (T) vor. Diese Basen sind N-glykosidisch jeweils mit einem Zuckermolekül (einer Desoxyribose) verknüpft. Dieses Molekül aus Base und Zucker heißt Nukleosid. Tritt als dritte Komponente noch die Phosphorsäure in das Molekül ein, so liegt das Nukleotid vor, der kleinste komplette Baustein der Nukleinsäuren. In ihm ist der Phosphatrest als 5'-Ester an die OH-Gruppe des Zuckers gebunden. Durch Polymerasen werden die Nukleotide zu langen Ketten verknüpft.



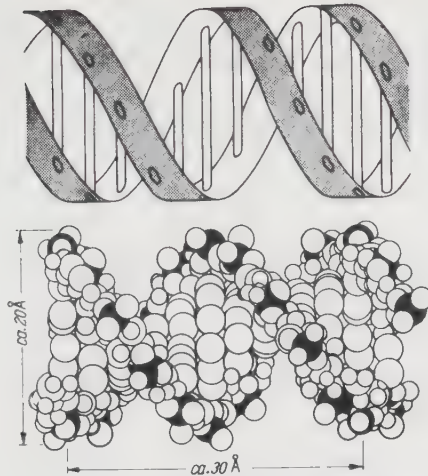
(aus: Du PRAW, S. 7)

Bei quantitativen Analysen von DNA - deren natürliches Molekulargewicht über 10^9 Dalton liegen kann - wurde gefunden, daß Adenin und Thymin wie Guanin und Cytosin im Molverhältnis von 1 : 1 stehen. WATSON und CRICK versuchten diese Ergebnisse mit den Resultaten der Röntgenstrukturanalyse in Verbindung zu bringen und entwickelten das nach ihnen benannte Modell der DNA. Das Modell schildert ein DNA-Molekül, in dem zwei Polynukleotidstränge einander gegenüber liegen, die durch Basenpaarung zusammengehalten werden. Jeweils zwischen zwei Basen bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen aus, und zwar zwischen Adenin und Thymin und zwischen Guanin und Cytosin. Daher muß ein Strang dem anderen komplementär sein, weil gegenüber dem Adenin des einen Stranges nur Thymin im anderen Strang vorkommen kann, und Guanin nur gegenüber von Cytosin möglich ist. (WATSON, 1963)



(aus: KARLSON, S. 107)

Um sich eine Vorstellung von der räumlichen Anordnung der DNA zu machen, muß man sich das Doppelstrangband um seine Längsachse verwunden denken. Das DNA-Molekül hat also die Form einer verdrehten Strickleiter mit den Basen als Sprossen und Zucker und Phosphat als Seitensträngen. Man kann das Molekül auch als Doppelschraube bzw. Doppelhelix beschreiben.



Struktur von DNA:
oben schematisch, unten als Atommodell

(aus: BRESCH, S. 144)

Die Ringmoleküle der Basen liegen in der Doppelhelix in einem Abstand von ca. $3.4 \text{ \AA}$ wie gestapelt flach und senkrecht zur Achsenrichtung aufeinander. Zwischen den hydrophoben, eng übereinanderliegenden Basen bilden sich Stapelkräfte (stacking forces) aus. Diese Kräfte stabilisieren die Doppelhelixstruktur der DNA. Etwa parallel zur Achse und senkrecht zu den Basen stehen die Zuckerringe. Eine Schraubenwindung der DNA umfaßt etwa zehn Basenpaare.

Betrachtet man die Sequenz der einzelnen Basen in einem DNA-Molekül, so scheint sie auf den ersten Blick sinn- und wahllos zu sein. Da man jedoch schon seit geraumer Zeit wußte, daß die DNA Trägerin der genetischen Information ist, versuchte man zu entschlüsseln, wie diese Information im Molekül gespeichert ist. Man fand, daß die Basen wie die Buchstaben einer Schrift einen Sinn

geben. Jeweils drei aufeinanderfolgende Basen tragen die Information für eine spezifische Aminosäure. Dieses System der Zuordnung von Basensequenz und Aminosäuren, auch genetischer Code genannt, ist vollständig bekannt. Die drei Basen, die für eine Aminosäure stehen, heißen Codon oder Triplett. So steht z.B. AAA für Phenylalanin und GUU für Glutamin. (s. Abb. mit komplementärem mRNA-Code).

Lexikon des genetischen Code (Triplettcode der m-RNA)

1. Base	2. Base				3. Base
U	U	C	A	G	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	
	Phe	Ser	Tyr	Cys	
	Leu	Ser	+	+	
C	Leu	Ser	+	Trp	U
	Leu	Pro	His	Arg	
	Leu	Pro	His	Arg	
	Leu	Pro	GluNH ₂	Arg	
A	Leu	Pro	GluNH ₂	Arg	U
	Ile	Thr	AspNH ₂	Ser	
	Ile	Thr	AspNH ₂	Ser	
	Ile	Thr	Lys	Arg	
G	Met ⁺⁺	Thr	Lys	Arg	U
	Val	Ala	Asp	Gly	
	Val	Ala	Asp	Gly	
	Val	Ala	Glu	Gly	
G	Val	Ala	Glu	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	
	Val	Ala	Asp	Gly	
	Val	Ala	Glu	Gly	

+) bedeutet Kettenende

++) bedeutet auch Kettenanfang bzw. N-Formyl-Met

(aus: BUDDECKE, S. 106)

Die Basensequenz der Nukleinsäure setzt also die Sequenz der Aminosäuren im Protein fest, die man auch als Primärstruktur des Proteins bezeichnet.

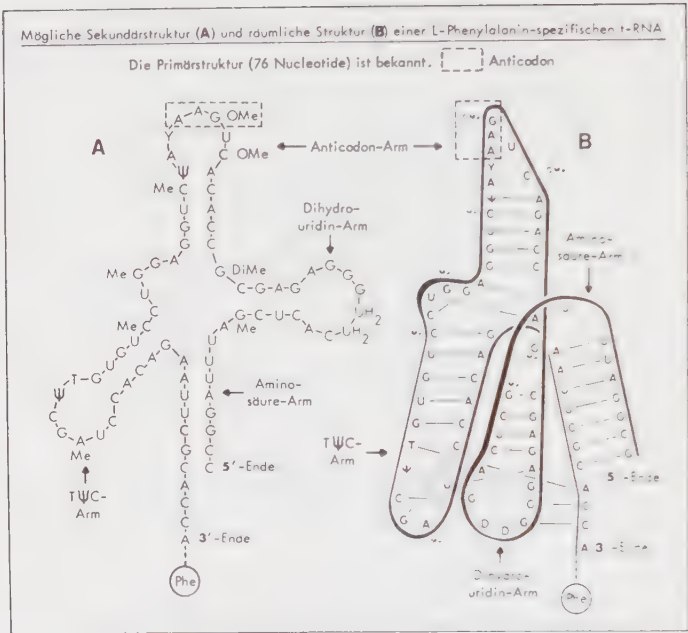
RNA

Als zweite Art von Nukleinsäuren kennen wir die RNA. Sie besteht wie die DNA aus Nukleotiden, wobei allerdings die

Base Thymin in der DNA durch Uracil in der RNA ersetzt wird. Außerdem kommt bei der RNA als Zuckerkomponente Ribose vor. Während die DNA nur als doppelsträngiges Molekül mit der beschriebenen Basenpaarung und Konfiguration vorkommt (Ausnahme bei einigen Viren), gibt es verschiedene Typen von RNA. Man unterscheidet messenger-RNA, transfer-RNA und ribosomale RNA. In diesen Molekülen liegt die RNA einsträngig oder doppelsträngig vor. Die RNA's sind im Verhältnis zur Lebensdauer der Zellen kurzlebig, im Gegensatz zur DNA, die stabil ist, solange die Zelle lebt. Die mRNA z.B. in schnell wachsenden E.coli Zellen wird zum Teil schon nach Sekunden wieder abgebaut. Die Konfigurationen der verschiedenen RNA-Typen sind sehr verschieden.

Messenger-RNA (mRNA) ist ein langes Fadenmolekül ohne Doppelstrangstücke und ohne Sekundär- und Tertiärstruktur.

Das Transferribonukleinsäuremolekül (tRNA) mit 75 bis 90 Nukleotiden hat eine ausgeprägt charakteristische Sekundär- und Tertiärstruktur. Typisch ist die Kleeblattform, die mehr oder weniger abgewandelt bei allen tRNA-Molekülen vorkommt.

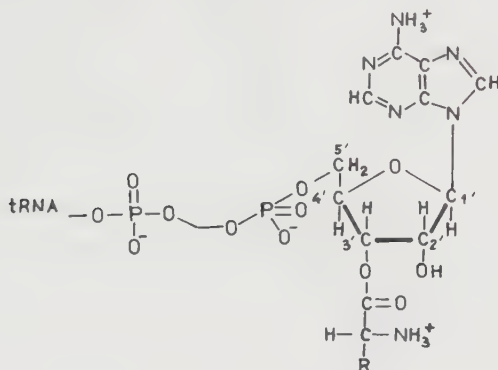


(aus: BUDDECKE, S. 108)

Es gibt so viele verschiedene tRNAs wie Codons, die eine Aminosäure bestimmen. Allen gemeinsam sind folgende Strukturen:

- (1) Ungefähr in der Mitte des Stranges liegt ein Triplet, das eine Aminosäurecodierung komplementär zu der der mRNA hat, das sogenannte Anticodon, das in einer offenen Schleife vorliegt;
- (2) das 3'-Ende, das immer von den Basen CCA gebildet wird und an dessen Adenylrest die Aminosäure angeheftet wird;
- (3) das 5'-Ende, das immer von Guanotin gebildet wird, und
- (4) einige Strukturen in einem Seitenarm, deren Funktion später zu besprechen ist.

Eine mit einer Aminosäure beladene tRNA wird als Aminoacyl-tRNA (AA-tRNA) bezeichnet.



Aminoacylated adenosyl end group of tRNA.

(aus: BOSCH, S. 17)

Die ribosomale RNA (rRNA) ist Bestandteil der Ribosomen. Ihre Sequenz ist nahezu aufgeklärt; sie hat Einstrang- und stellenweise Doppelstrangcharakter.

Ribosomen sind kleine Zellpartikel mit einem Durchmesser von ungefähr 150 Å und einer Sedimentationskonstante von 70S bei Bakterien und 80S bei Eucaryonten, wobei hier die Ribosomen auf dem sogenannten endoplasmatischen Retikulum sitzen. Dieses besteht aus einem weitverzweigten System von feinsten Kanälchen, die mit der äußeren Membran der Doppelmembran des Kerns in Zusammenhang stehen. Ein Teil dieses endoplasmatischen Retikulums ist glatt, der andere rauh, d.h. dicht besetzt von Ribosomen. Jede Zelle enthält 5 - 50 000 Ribosomen.

Die Ribosomen bestehen ungefähr zu zwei Dritteln aus der schon erwähnten rRNA und zu einem Drittel aus Protein. Die 70S Ribosomen der Prokaryoten, und die Ribosomen,

die in den Mitochondrien der Eukaryoten vorkommen, zerfallen in Magnesium-freiem Medium in zwei Untereinheiten, die 30S und 50S Partikel. Diese enthalten ein bzw. zwei Typen ribosomaler RNA: die 30S Untereinheit 16S-rRNA, deren Nukleotidsequenz nahezu aufgeklärt ist, die 50S Untereinheit enthält 23S rRNA und zusätzlich eine 5S rRNA, deren Nukleotidsequenz von Sanger aufgeklärt wurde. Die Ribosomen in Eukaryoten sind etwas größer; sie enthalten anstelle von 70S 80S Ribosomen, deren Untereinheiten Sedimentationskoeffizienten von 40S bzw. 60S haben; die rRNAs haben Sedimentationskoeffizienten entsprechend von 18S, 28S und ebenfalls 5S.

Die 30S Untereinheit von E.coli enthält 21 Proteine, die 50S Untereinheit 34 Proteine. Die genaue Anzahl der Ribosomenproteine von Eukaryoten ist noch nicht bekannt.

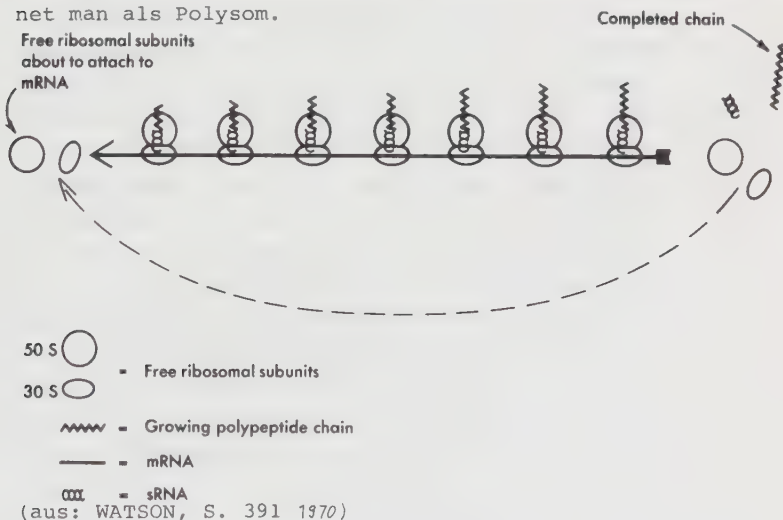


(aus: BRESCH, S. 222)

Am Ribosom lassen sich 2 Seiten oder Stellen unterscheiden, die beladene Transfer-Ribonukleinsäuren binden können. Die eine Seite bindet Aminoacyl-tRNA und hat den Namen Aminoacyl- oder Acceptor-Seite (A-Seite), die andere bindet Peptidyl-tRNA und heißt Peptidyl-Seite (P-Seite) oder Donor-Seite.

Die Aufgabe der Ribosomen bei der Proteinbiosynthese ist es, jederzeit die nötige und richtige räumliche Anordnung aller beteiligten Moleküle, Enzyme und Faktoren zu gewährleisten, die während der Proteinbiosynthese ständig angelagert werden und wieder abdissoziieren. Ein Enzym, die Peptidyltransferase, ist sicher ein fester Bestandteil des Ribosoms, genauer gesagt der 50S Untereinheit.

Eine mRNA kann nicht nur von einem Ribosom abgelesen werden, sondern es ist möglich, daß sich mehrere Ribosomen gleichzeitig an eine mRNA anheften und sie übersetzen. Dabei entstehen also gleichzeitig mehrere identische Proteine. Den Komplex aus mehreren Ribosomen und mRNA bezeichnet man als Polysom.



Wir kennen eine ganze Anzahl von Faktoren, die an der Proteinbiosynthese beteiligt sind. Sie lassen sich nach ihrer Funktion den Stadien der Proteinbiosynthese zuordnen. Sie werden als Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktoren bezeichnet. Zu den Initiationsfaktoren gehören bei den Prokaryoten IF_1 , IF_2 , α und β , und IF_3 , in 2 Typen α und β , die verschiedene Affinität zu den mRNA-Codons AUG

und GUG haben. Dem entsprechen M_1 , M_2 und M_3 bei den Eukaryoten. Elongationsfaktoren sind bei den Prokaryoten T_u , T_s und G bzw. bei Eukaryoten T_1 und T_2 , wobei T_1 einem Komplex aus T_u und T_s entspricht und T_2 dem Faktor G. Terminationsfaktoren sind R_1 , R_2 , S, TR und DF bei Prokaryoten und R bei Eukaryoten. DF ist dem Initiationsfaktor IF_3 sehr ähnlich, eventuell sogar identisch mit ihm. Die Molekulargewichte dieser Faktoren liegen in der Größenordnung von 9 000 (IF_1) bis 100 000 (IF_2). Als Energiedonator dient bei allen faktorenabhängigen Vorgängen Guanosintriphosphat (GTP).

Das sonst als Energiedonator meist vorkommende ATP spielt in diesem Zusammenhang hauptsächlich eine Rolle bei der Aktivierung der Aminosäuren. Zunächst wird ATP mit einer Aminosäure unter Abspaltung von Pyrophosphat gebunden, und dann diese so aktivierte Aminosäure auf die 3'-Hydroxylgruppe der endständigen Ribose im CCA-Ende der tRNA übertragen. Katalysiert wird dieser Reaktionsschritt durch spezielle Aminoacyl-tRNA-Synthetasen. Die Synthetasen sind jeweils für eine Aminosäure spezifisch. Sie müssen je zwei aktive Gruppen besitzen, von denen die eine die Sequenz im Triplet des tRNA Anticodons erkennen muß, die andere dafür sorgen muß, daß an die so identifizierte tRNA nur die dazu spezifisch passende Aminosäure gebunden wird. Bei der Anlagerung der aktivierten Aminosäure an die tRNA wird AMP wieder freigesetzt. Übrig bleibt die beladene tRNA.

Transcription

Wenn in der Zelle ein Protein gebildet werden soll, muß zunächst dessen Bauplan von der DNA im Zellkern zum Ort der Proteinsynthese, den Ribosomen, im Cytoplasma gebracht werden. Wenn man überlegt, daß jede Zelle eines Organismus in ihrer DNA die gesamte genetische Information aller Zel-

len gespeichert hat, so versteht man, daß es unsinnig wäre, jedes kleine Protein direkt nach dieser Gesamtbauanleitung synthetisieren zu lassen. In der Zelle wird vielmehr nur eine Kopie der wirklich für die einzelne Synthese notwendigen Information gemacht und zu den Ribosomen transportiert.

Auf der molekularen Ebene spielt sich dieser Vorgang folgendermaßen ab: Aufgrund vielfältiger Regelmechanismen werden an einer bestimmten Region der DNA die Wasserstoffbrückenbindungen gespalten, und die DNA entspiralisiert sich ein Stück weit. An einem der beiden so freigelegten Stränge lagert sich das Enzym RNA-Polymerase an. Es tastet den DNA-Einzelstrang Nukleotid für Nukleotid ab. Im Bereich der RNA-Polymerase wird nun jedem DNA-Nukleotid das basenkomplementäre RNA-Nukleotid gegenübergestellt. Die RNA-Nukleotide werden untereinander mit Esterbindungen verknüpft und beim Weiterwandern der RNA-Polymerase Schritt für Schritt wieder von der DNA durch Auflösung der Wasserstoffbrückenbindungen getrennt. Am Ende des abzulesenden DNA-Stückes stoppt die RNA-Polymerase und gibt den basenkomplementär kopierten mRNA-Strang frei.

Auf noch nicht ganz geklärte Weise wird nun die mRNA, wahrscheinlich durch das endoplasmatische Retikulum, zu den Ribosomen transportiert. Den Vorgang der Kopierung der DNA auf eine mRNA nennen wir Transcription.

Translation

Die folgende Übertragung der mRNA-Sequenz in eine Aminosäuresequenz wird als Translation bezeichnet. Sie verläuft in drei Schritten: Initiation, Elongation und Termination.

Initiation

Unter dem Begriff Initiation fassen wir alle Vorgänge zusammen, die zum Aufbau eines funktionsfähigen, an mRNA ge-

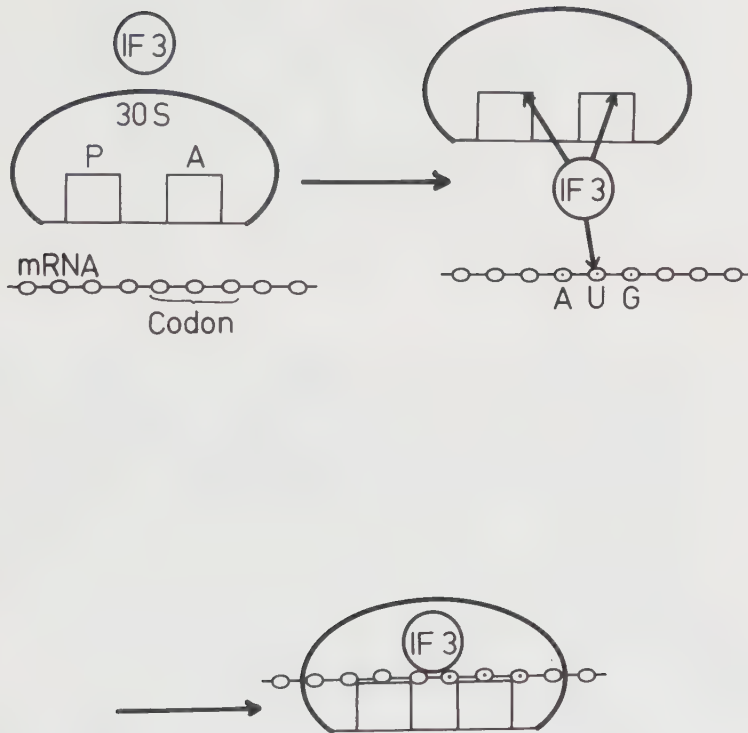
bundenen 70S Ribosoms nötig sind. Das Ablesen der mRNA beginnt an einer typischen Stelle, dem sogenannten Starter-Codon, das von dem Triplet AUG oder GUG gebildet wird.

Diese beiden Triplets codieren für Methionin, und werden von zwei verschiedenen Methionyl-tRNAs erkannt. Von diesen kann die eine, Methionyl-tRNA_{fMet}, an der Aminogruppe des Methionins formyliert werden, die andere, Methionyl-tRNA_{mMet}, kann es nicht. Die Met-tRNA_{fMet} wird nach der Anlagerung von Methionin an die tRNA von der Met-tRNA-Transformylase formyliert.

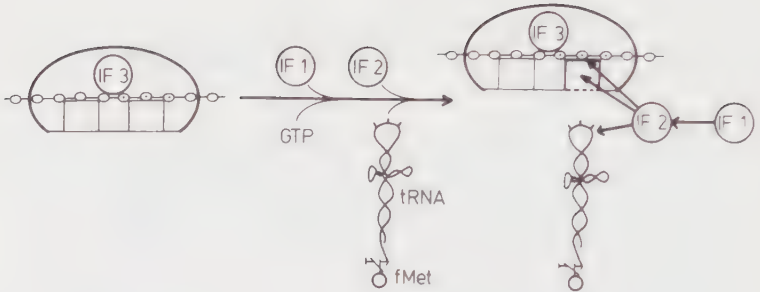
Die Ribosomen liegen während der Zeit, in der sie keine Proteine synthetisieren, zum Teil gespalten in ihre 30 und 50S Untereinheiten vor. Die 30S Untereinheit erkennt selektiv das Initiationscodon an der mRNA und heftet sich an diese Stelle. An diesen Komplex bindet sich noch die f Met-tRNA und bildet damit den sogenannten Initiationskomplex.

Aufgabe des Initiationsvorganges ist es, alle bei der Proteinbiosynthese nötigen Moleküle in den funktionell richtigen Zusammenhang zu bringen.

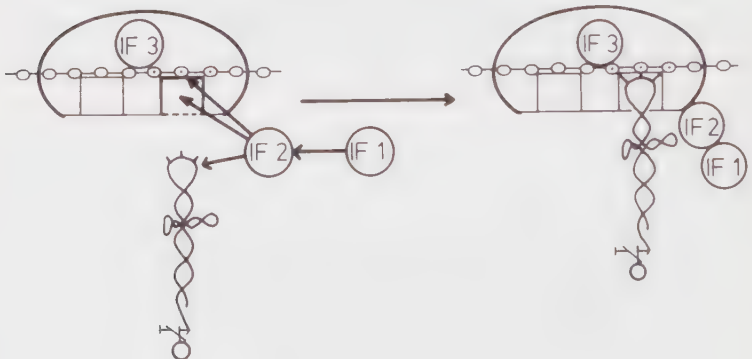
Als erstes wird der Initiationsfaktor IF 3 α oder β mit der ersten Bindungsstelle an eine 30S Untereinheit gebunden. Der Faktor erkennt das Initiationscodon AUG oder GUG oder legt dieses Triplet aus der Sekundärstruktur der mRNA frei. Da er mit seiner zweiten Bindungsstelle auch die mRNA am 5'-Ende bindet, koppelt er so mRNA und 30S-Ribosom. Dazu sind Magnesiumionen nötig.



Im nächsten Schritt wird an den mRNA-30S Komplex die Formyl-methionyl-tRNA angelagert, für die AUG codiert. Zur Bildung dieses sogenannten 30S Initiationskomplexes aus mRNA, 30S und f Met-tRNA ist die Anwesenheit von IF 2, IF 1 und GTP nötig.



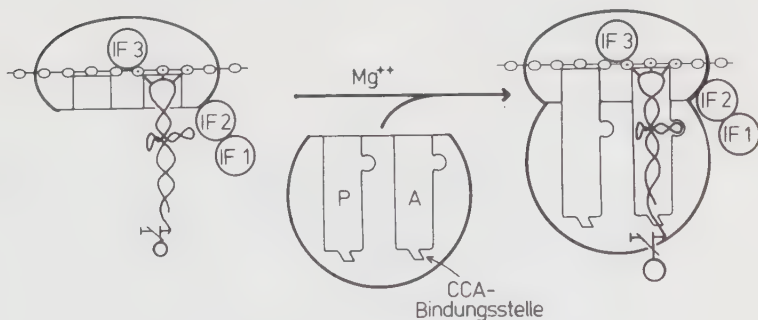
IF 2, f Met-tRNA und GTP bilden dabei eventuell einen schwachen Komplex, der sich leicht an den 30S-Initiationskomplex anlagern kann, oder es lagert IF 2 zuerst an 30S und zieht dann GTP und f Met-tRNA nach. IF 1 unterstützt die Bindung von f Met-tRNA ans Ribosom, ist eventuell selbst inaktiv, stimuliert aber die Wirkung von IF 2. IF 2 wirkt sehr spezifisch und bindet nur f Met-tRNA, die als einzige tRNA einen stabilen Initiationskomplex bildet.



Für diese Bindung ist GTP erforderlich. GTP wird dabei allerdings nicht sofort zur Energielieferung gespalten. Das kann man daran sehen, daß es durch das nicht hydro-

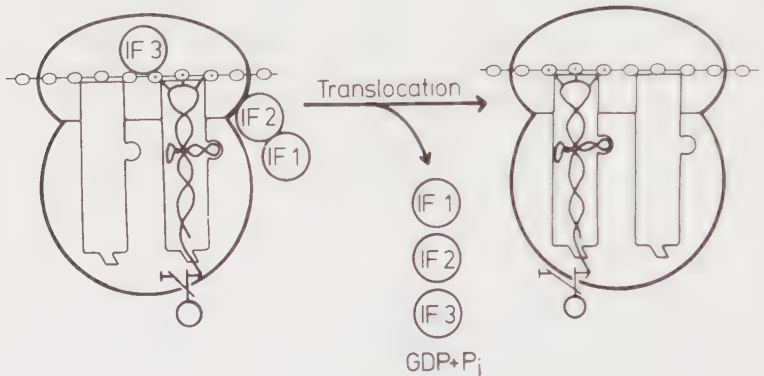
lysierbare analoge 5'-Guanylyl-methylen-diphosphonat (GMP-PCP) ersetzt werden kann. Der so entstandene Initiationskomplex ist jedoch beim folgenden Peptidyltransfer inaktiv. Das GTP wird erst nach der Kombination des Initiationskomplexes mit der 50S Untereinheit bei der Abspaltung von IF 2 hydrolysiert, was nur in Anwesenheit von IF 1 geht, der für die Abspaltung von IF 2 und eventuell GDP von 70S Ribosomen nötig ist. Vielleicht ist es so, daß IF 1 dazu beiträgt, das GDP in einem IF 2 - GDP-Komplex gegen GTP auszutauschen.

Der 30S Initiationskomplex wird im nächsten Schritt zum 70S Initiationskomplex erweitert. Dies geschieht durch Mg^{++} -abhängige Kombination mit der 50S Untereinheit. Der 70S Initiationskomplex besteht also aus mRNA, 30S Untereinheit, f Met-tRNA, IF 2, IF 3, GTP und 50S Untereinheit.



Im letzten Schritt der Initiation werden vom 70S Komplex die Initiationsfaktoren freigesetzt, und dabei das GTP hydrolysiert und ebenfalls freigesetzt. Schließlich wird die f Met-tRNA von der Translokase aus der A-Seite in die P-Seite transportiert. Eventuell wird die f Met-tRNA auch durch IF 2 direkt in die P-Seite gebracht, und die GTP-Energie dazu verwendet, das CCA-Ende der tRNA in eine

Stellung zu bringen, die den Angriff der Peptidyltransferase erlaubt.

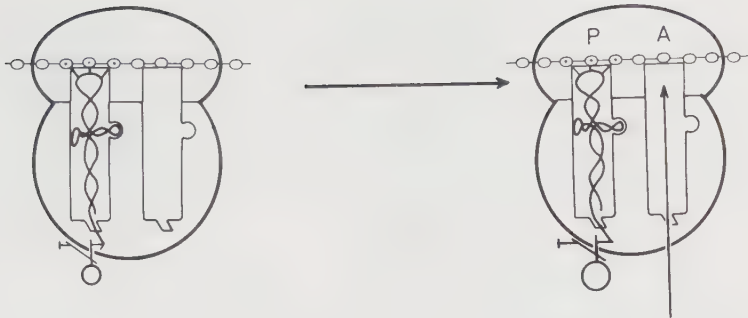


Damit ist jedenfalls die Initiation beendet und das Ribosom bereit zur schrittweisen Aneinanderkettung der codierten Aminosäuren.

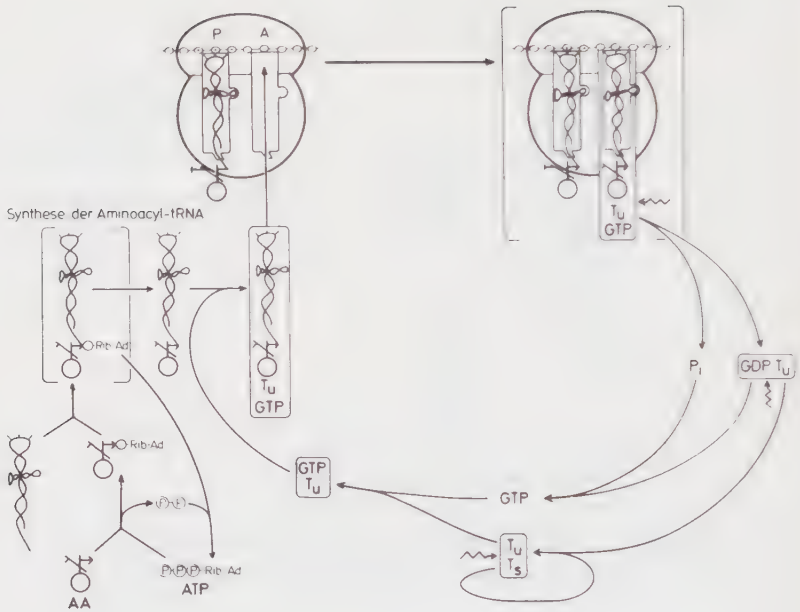
Elongation

Ist die Initiation abgeschlossen, so folgt das Stadium der Elongation, in dem alle Aminosäuren eines Proteins zu einer langen Kette verknüpft werden. Unter Elongation verstehen wir eine Reihe von Vorgängen, die sich immer wiederholen bei jeder neuen Aminosäure, um die die Kette verlängert wird. Daher kann man auch von einem Elongationszyklus sprechen.

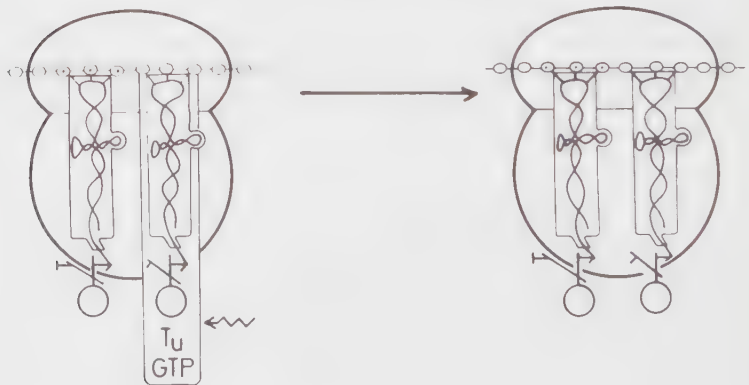
Wir unterscheiden drei Phasen bei der Elongation. Im ersten Schritt wird eine mit einer Aminosäure beladene tRNA (Aminoacyl-tRNA) ans Ribosom gebunden: Nach der Translokation der ersten f Met-tRNA ist die A-Seite wieder frei, und kann die neue Aminoacyl-tRNA aufnehmen, die durch das nächste Codon gefordert ist.



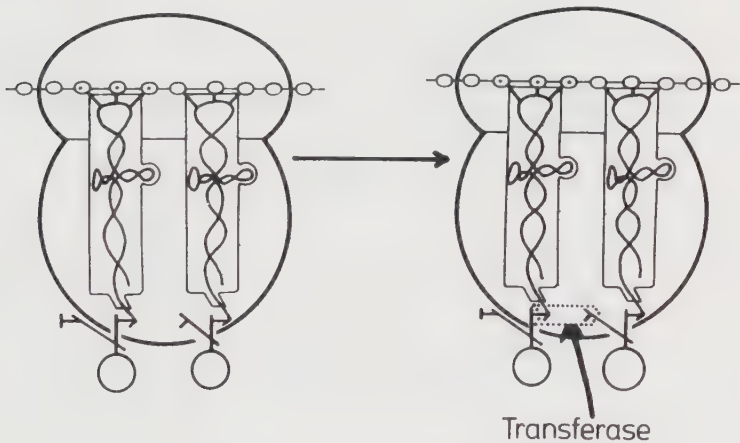
Die Aminoacyl-tRNA (AA-tRNA) wird "aktiviert" durch Bildung eines ternären Komplexes mit dem Faktor T_u und GTP. T_u wirkt als Carrier und heftet die AA-tRNA ans Ribosom. Dabei wird GTP gespalten und verläßt als T_u -GDP-Komplex und anorganisches Phosphat (P_i) das Ribosom. Der Faktor T_u wird in einem eigenen Zyklus wieder regeneriert: Kommt der T_u -GDP-Komplex mit dem Faktor T_s zusammen, so verdrängt dieser das GDP aus seiner Bindung und bildet selbst den sehr stabilen T_u - T_s -Komplex. T_s seinerseits kann wieder verdrängt werden, wenn GTP und eine neue beladene tRNA zur Verfügung steht. Der dann gebildete T_u -GTP-AA-tRNA-Komplex wird wieder ans Ribosom angelagert.



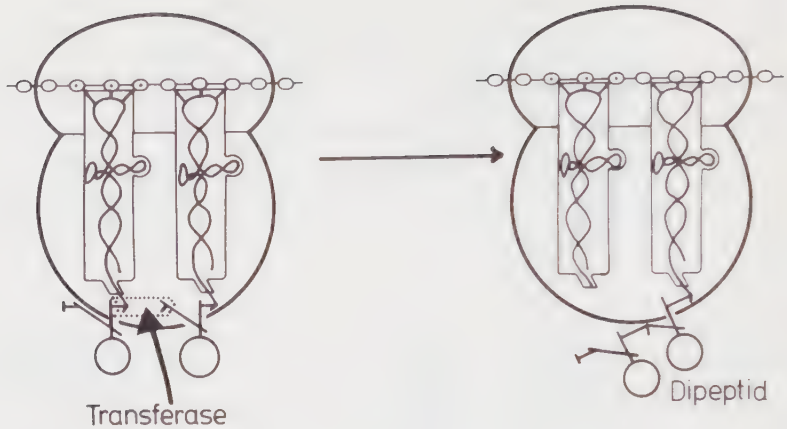
Die Fixierung einer tRNA am Ribosom erfolgt über drei Punkte: Durch die Bindung zwischen mRNA-Codon und tRNA-Anticodon, durch die Anheftung des CCA-Endes an das 50S Ribosom und durch Wechselwirkung zwischen Ribosom und bestimmten Strukturen in einem Seitenarm der tRNA.



Die Peptidbindung ist das Ergebnis des nächsten Schrittes. Am Ribosom hängen zwei beladene tRNAs nebeneinander: in der P-Seite die fMet-tRNA und in der A-Seite die nächstfolgende tRNA. Das Enzym Peptidyltransferase, das Bestandteil der 50S Untereinheit ist, knüpft nun zwischen der räumlich benachbarten α -Aminogruppe der zweiten Aminosäure und der Carboxylgruppe von Formylmethionin eine Peptidbindung.



Gleichzeitig wird die Esterbindung zwischen der tRNA und Formylmethionin gespalten. Das Methionin hat also eine neue Bindestelle und die tRNA-fMet wird frei. Die zweite tRNA ist durch die Übertragung von Formylmethionin nun mit zwei Aminosäuren beladen und kann als (Di-)Peptidyl-tRNA bezeichnet werden.

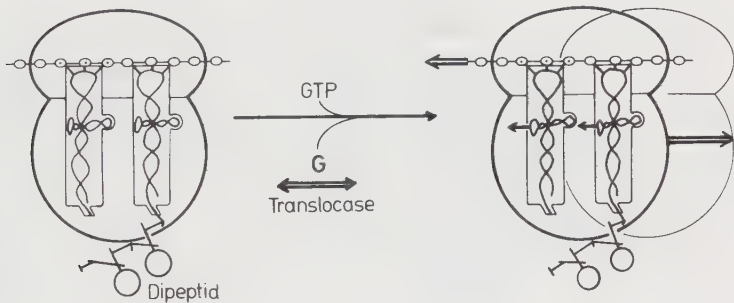


Die Peptidbindung wird ohne Beteiligung von Faktoren mithilfe der in der Aminoacyl-tRNA enthaltenen Energie geknüpft. In diesem Stadium haben wir also ein Ribosom vor uns, bei dem in der A-Seite eine Peptidyl-tRNA angeheftet ist und in der P-Seite eine freie tRNA.

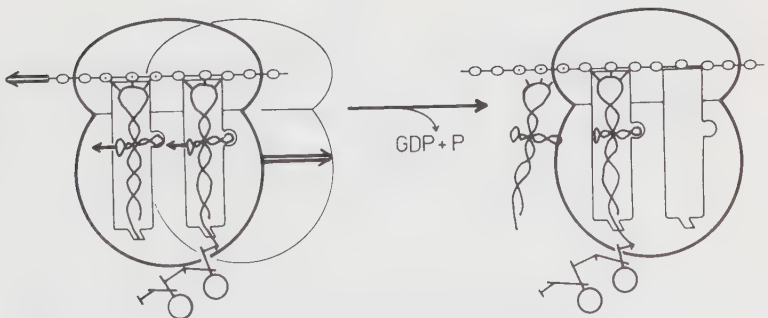
Es gibt Hinweise darauf, daß es außer der hier erwähnten A-Seite noch weitere Seiten für ankommende mRNA-Tripletts gibt. Dadurch würde jeder AA-tRNA schon einige Schritte vor dem Einbau ihrer Aminosäure Zeit gegeben, sich an das entsprechende Codon zu binden. Dies führte zu einer erheblichen Beschleunigung der Syntheserate, da das Zusammenfinden von tRNA und Codon nur durch Diffusion vor sich geht, und so unter Umständen relativ lange dauern würde. (Swan et al. 69)

Jede Elongationsphase wird im dritten Schritt mit einer Translokation abgeschlossen, ähnlich dem letzten Schritt der Initiation. Um die A-Seite frei zu machen für die AA-tRNA wird die Peptidyl-tRNA, die durch die Peptidyl-

Transferase entstanden ist, von der A-Seite in den P-Seite transportiert. Gleichzeitig wird die freie tRNA aus der P-Seite freigesetzt und vom Ribosom gelöst. Da bei dieser Verschiebung von A nach P die Verbindung zwischen Codon und Anticodon bestehen bleibt, wird die mRNA ebenfalls um ein Triplet weitertransportiert, oder, was das gleiche ist, das Ribosom gleitet um ein Triplet auf der mRNA weiter.



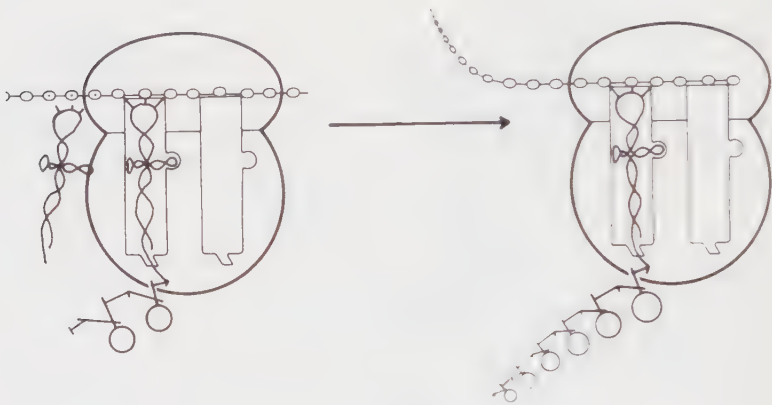
Die A-Seite ist jetzt frei für die Aufnahme der nächsten AA-tRNA.



Den Transport der Peptidyl-tRNA von A nach P besorgt der Faktor G. Die dazu nötige Energie wird durch Abspal-

tung von GTP gewonnen, das in diesem Falle nicht durch GMP-PCP ersetzt werden kann.

Die drei Schritte der Elongation (Anlagerung von AA-tRNA, Peptidbindung, Translokation) wiederholen sich nun so oft, wie es die mRNA durch ihre Tripletts vorschreibt. Ist das gewünschte Protein komplett, so wird die Elongation abgebrochen.



Termination

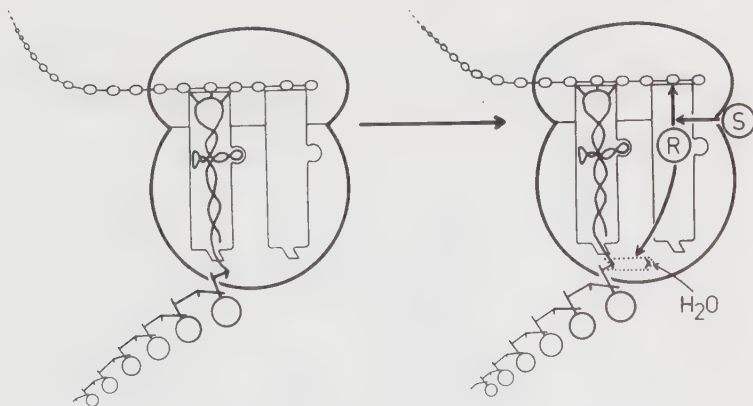
Entsprechend den Tripletts für den Beginn der Proteinsynthese gibt es Codons, die als Terminator dienen. Ihre Aufgabe ist es, die Synthese an einer ganz bestimmten Stelle zu stoppen. Ohne sie würden mehrere Proteine, die auf einer mRNA codiert sind, an einem Stück abgelesen werden.

Auch der Terminationsablauf lässt sich in drei Schritte untergliedern.

Am Ende der Elongation trägt das Ribosom eine tRNA in

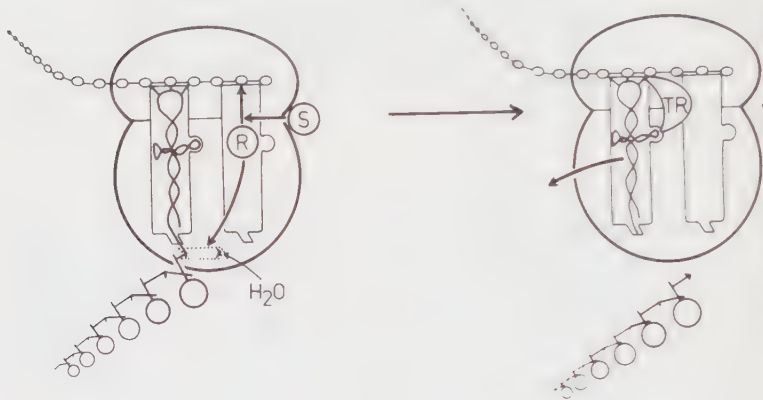
der P-Seite, die als Peptidylrest das vollständige Protein trägt. Bei dem Transport dieser tRNA von der A-Seite nach der P-Seite wurde das Terminatorcodon in die A-Seite gebracht. Da es für das Terminatorcodon keine basenkomplementäre tRNA gibt, stockt die Elongation. Dieses Halten ist jedoch nur passiv und reicht nicht dazu aus, das Protein vom Ribosom zu lösen. Das ist Aufgabe der Faktoren R_1 und R_2 .

Von den drei Terminatorcodons erkennt R_1 UAA und UAG, R_2 UAA und UGA. Bei diesen Codons bindet sich R_1 oder R_2 unter Aktivierung eines Faktors S an das Ribosom. Anstelle einer weiteren AA-tRNA reagiert das Carboxylende der letzten Aminosäure mit Wasser, wodurch das Protein seine Bindung an die letzte tRNA verliert und freigesetzt wird. Die Peptidyltransferase wird dabei für einen Moment zur Hydrolase und überträgt den Peptidylrest auf Wasser.

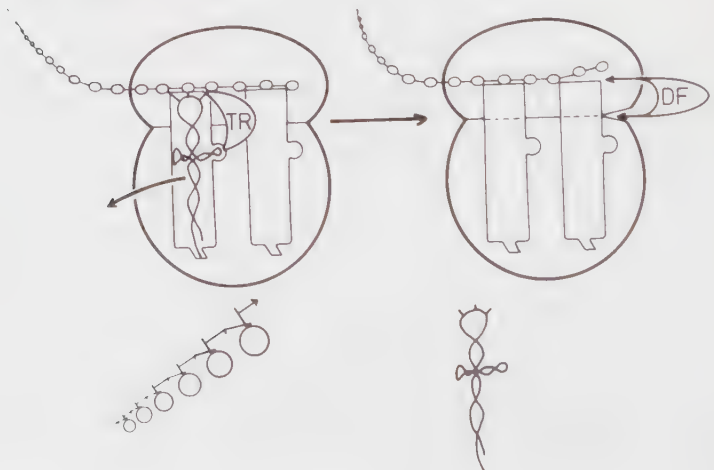


Der zweite Terminationsschritt führt anschließend zur Freisetzung der letzten tRNA vom Ribosom. Dies kann nicht wie sonst bei der Elongation von der Translokase bewerkstelligt werden, da sie nur wirksam ist, wenn eine tRNA in der A-Seite gebunden ist. Bei der Termination ist die

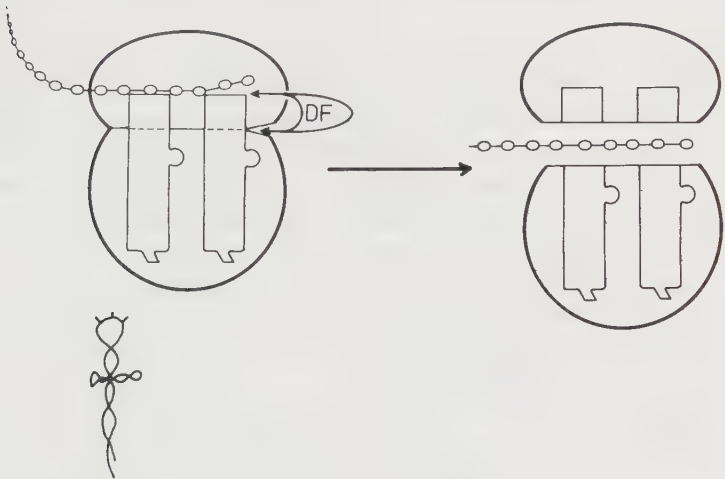
A-Seite ja aber frei. Hier greift nun der Faktor TR ein und befreit die letzte tRNA ohne Energieverbrauch.



Im letzten Terminationsschritt wird nun der Zustand des Ribosoms wieder hergestellt, der vor Beginn der Initiation vorgelegen hat. Der Faktor DF löst die Verbindung von 30S und 50S Untereinheit und trennt die mRNA von der 30S Untereinheit.



Damit ist die Synthese des Proteins abgeschlossen und die Bausteine der "Synthesemaschinerie" können sich bei Bedarf erneut zum Initiationskomplex zusammenlagern.



Der Dissoziationsfaktor DF ist mit größter Wahrscheinlichkeit identisch mit dem Initiationsfaktor IF 3. Er würde also solange an die 30S Untereinheit gebunden bleiben, bis eine neue Initiation stattfindet. Neuere Befunde sprechen dafür, daß die Dissoziation ohne Faktoren geschieht, der Dissoziationsfaktor bzw. IF 3 aber eine Assoziation der freien 30S und 50S Untereinheiten verhindert.

Bei der Betrachtung der Initiation haben wir gesehen, daß (in Prokaryoten) jedes Protein mit der Aminosäure Formylmethionin beginnen muß. Untersucht man aber die Proteine einer Zelle, so wird man nur ausnahmsweise eines finden, das tatsächlich Methionin am Aminoende hat. Dies bedeutet, daß primär Methionin abgespalten werden muß. Es wurden Enzyme isoliert, die Formylgruppen von f Met-Peptiden abspalten, jedoch nicht von fMet

oder fMet-tRNA. Anschließend kann das so durch Deformylierung freigewordene Methionin durch eine spezielle Aminopeptidase vom Peptid abgespalten werden.

Proteinsynthese in Eukaryoten

Der bisher beschriebene Mechanismus trifft nur für Prokaryoten zu und für die Mitochondrien von Eukaryoten, die möglicherweise aus Prokaryoten entstanden sind. Bei Eukaryoten spielen sich die Vorgänge jedoch sehr ähnlich ab, so daß darauf verzichtet werden kann, alle Stadien der Proteinsynthese nochmals zu beschreiben. Hier sollen nur die wesentlichen Unterschiede kurz aufgezählt werden:

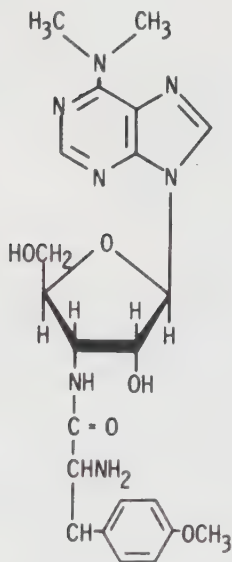
- (1) Eukaryoten haben 80S Ribosomen, die aus 40S und 60S Untereinheiten bestehen;
- (2) als Initiator tRNA dient Met-tRNA_F;
- (3) den Initiationsfaktoren IF 1, IF 2 und IF 3 entsprechen bei Eukaryoten die Faktoren M 1, M 2 und M 3;
- (4) dem T_uT_s Komplex während der Elongation entspricht der Faktor T 1, dem Faktor G der Faktor T 2;
- (5) es gibt nur einen Faktor R bei der Termination.

Da die zellfreien Proteinbiosynthesesysteme aus Eukaryoten schwieriger zu handhaben sind, sind sie noch weniger gut bekannt. Es können sich daher noch weitere Unterschiede herausstellen.

Entdeckung, Struktur und Synthese von Puromycin

Porter et al. isolierten erstmals Puromycin 1952 aus Kolonien von *Streptomyces alboniger*. 1957 gaben SZUMSKI und GOODMAN ein Optimalmedium zur Gewinnung von Puromycin an. Puromycin ist heute im Handel erhältlich, 1g kostet ca. 1300.--DM.

Die Struktur wurde 1953 von WALLER et al. durch Hydrolyse zu folgenden Einzelbestandteilen aufgeklärt: 6-Dimethylaminopurin, methoxy-L-tyrosin und 3-Amino-3-Desoxyribose. Daraus ergab sich als Strukturformel für Puromycin:



Puromycin

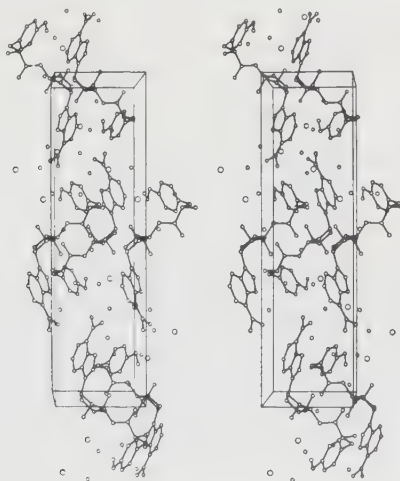
(aus: FRANKLIN und
SNOW, S. 92)

6-Dimethylamino-9-(3-(p-methoxy-L-β-phenylalanyl-amino)3-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-purin. Diese Strukturformel wurde durch Synthese durch BAKER et al. (1955 a + b) und anschließenden Vergleich der gewonnenen Substanz mit natürlichem Puromycin eindeutig bestätigt.

Puromycin hat die Summenformel $C_{22}H_{29}O_5N_7$ und ein Molekulargewicht von 471,52. Der Schmelzpunkt liegt bei 175 - 177°C. In Äthanol weist Puromycin eine optische Drehung von -11° auf. Das Absorptionsmaximum von Puromycin liegt bei 267.5 nm, gemessen in 0.1 n HCl. Der

pK-Wert der unsubstituierten Aminogruppe liegt bei 7.3, der des Purins bei pH 3.7. Puromycin ist bei neutralem pH stabil und in gefrorenem Zustand lange haltbar.

Auch beschrieben sie, daß der hemmende Effekt von Puromycin z.T. auf der Fähigkeit des protonierten Amidstickstoffs zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zur aktiven Stelle der Peptidsynthetase zu suchen ist. Im Kristall liegt Puromycin als Dihydrochlorid-pentahydrat vor und ist an N_1 der Adeninbase und der Aminogruppe des Tyrosin protoniert. Durch das Stapeln des Methoxy-tyrosins zwischen die Nukleinsäurebasen ist Puromycin ein gutes Beispiel für Intercalation von aromatischen Seitenketten von Proteinen mit Nukleinsäuren. Im Kristall liegen die einzelnen Puromycinmoleküle zickzackförmig Kopf an Schwanz nebeneinander, wobei der Abstand von $3.4 \text{ \AA}$ auftritt.



(aus: SUNDARALINGAM (72), S. 61)

Diese Weise der Stapelung könnte z.B. wichtig sein im gegenseitigen Erkennen von Proteinen und einsträngigen Nukleinsäuren. Die Seitenketten von Phenylalanin und Tryptophan im Protein müßten leichter zu stapeln sein als Tyrosin mit seiner p-Hydroxylgruppe, die das Bestreben hat, Wasserstoffbrücken auszubilden. Das Stapeln scheint auf einer hydrophoben Wechselwirkung zu beruhen,

da unmethyliertes Puromycin nicht so aktiv reagiert.

Es wurden verschiedene Modifikationen von Puromycin mit unterschiedlichen Aminosäureresten synthetisiert. Diese Moleküle zeigten recht unterschiedliche Hemmwirkungen (s.S. 42).

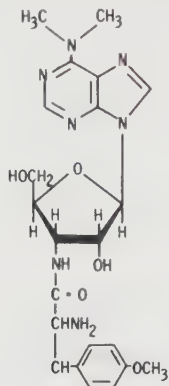
Inhibition of leucine transfer from sRNA to protein by puromycin analogues

Compound	Conc., M	% Inhibition
puromycin	10^{-4}	83
	10^{-3}	93
2'-puromycin isomer	10^{-3}	0
5'-puromycin isomer	10^{-3}	0
3'-aminonucleoside	10^{-3}	0
L-phenylalanyl analogue	10^{-5}	49
	10^{-4}	79
	10^{-3}	90
D-phenylalanyl analogue	10^{-4}	17
	10^{-3}	35
L-leucyl analogue	10^{-4}	10
	10^{-3}	35
L-prolyl analogue	10^{-4}	10
	10^{-3}	9
glycyl analogue	10^{-3}	7
glycyl-p-methoxy-L-phenylalanyl analogue	10^{-4}	10

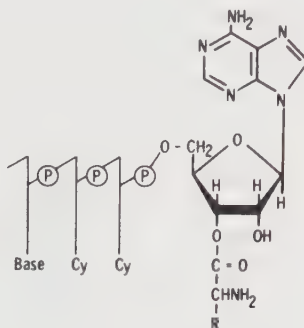
(aus: NATHANS (67), S. 267)

Ebenfalls synthetisiert wurde radioaktives Puromycin mit ^{14}C , ^3H und ^{32}P (Allen und Zamecknik, 1962; Shelton und Clark, 1967; Smith et al., 1965; Montgomery und Thomas, 1962; Nathans und Neidle, 1963; Symons et al., 1969).

YARMOLINSKY und DE LA HABA erkannten 1959 zuerst die Ähnlichkeit zwischen dem 3'-Ende der Aminoacyl-tRNA und Puromycin.



Puromycin



Terminus of aminoacyl tRNA

(aus: FRANKLIN und SNOW, S. 92)

Beiden Molekülen ist die D-Ribosylgruppe gemeinsam, die in 8 glykosidisch an Adenin oder ein Adeninderivat gebunden ist, und in 2' oder 3' mit einer Aminosäure substituiert ist. Sie konnten zeigen, daß die Bindung der Carboxylgruppe der Aminosäure an die 2' oder 3' Hydroxylgruppe des Adenosin ähnlich ist der des p-Methoxytyrosin in Puromycin, bei dem die Carboxylgruppe kovalent an die 3'-Aminogruppe der 3'-Desoxy-3'-aminoribosylgruppe gebunden ist. Im Puromycin ist die Aminosäure also über eine Peptidbindung in 3' an das Nukleosid gebunden, während Aminoacyl-tRNA aus einem Gleichgewicht aus 2' und 3' Aminoacylestern bestehen.

YARMOLINSKI und DE LA HABA zeigten weiter, daß Puromycin den Transfer von ^{14}C -Leucin von seiner tRNA auf die ans Ribosom gebundene wachsende Peptidkette hemmt. Sie schlugen vor, daß Puromycin als ein Analoges für die Aminoacyl-tRNA wirkt, und auf dieser Hypothese basieren die meisten Studien über den Wirkungsmechanismus von Puromycin.

Welche strukturellen Bestandteile sind nun für die Wirkung von Puromycin erforderlich? Zur Aufklärung dieser Frage setzte man die modifizierten Puromycinmoleküle (s.S. 40) in einen standardisierten Test ein und konnte feststellen, wieviel Hemmwirkung die einzelnen Modifikationen im Vergleich zu Puromycin erbrachten. Die Ergebnisse sind folgende:

- (1) Sowohl die Aminosäureseitenkette als auch das Aminonukleosid sind erforderlich;
- (2) die Aminosäure muß in L-Konfiguration vorliegen;
- (3) die Aminogruppe der Aminosäure darf nicht substituiert sein;
- (4) die Aminogruppe des Nukleosids muß sich in 3'-Position befinden;
- (5) die Aminosäureseitenkette ist von Bedeutung: Phenylalanin und O-Alkyltyrosin sind sehr aktiv, während Glycin und Prolin inaktiv sind (NATHANS und NEIDLE, 1963; SYMONS et al., 1969; HARRIS et al., 1971).

Diese Befunde deuten darauf hin, daß das Analogiekonzept der Wirkung weitgehend richtig ist. Auch dadurch, daß tRNA-Fragmente, die nur das CCA-Ende tragen, wie Puromycin wirken, wird das Analogiekonzept unterstützt. Warum jedoch die Hemmwirkung Aminosäureseitenkettspezifisch ist, war lange Zeit unklar. Erst die neueren Untersuchungen von SUNDARALINGAM (s.S. 38) geben Hinweise darauf, daß hier das Stapeln der Seitenkettenringe und der Adeninringe eine Rolle spielen könnte. Aus der Notwendigkeit der 3'-Form kann man folgern, daß die aktive Form der tRNA auch als 3'-Form vorliegt (WOLFENDEN et al., 1964; McLAUGHLIN und INGRAM, 1965 a + b).

Wirkungsspektrum

Das erstaunlich breite Wirkungsspektrum des Puromycins beruht wohl darauf, daß offensichtlich das Aminoacyl-ende der tRNAs in prokaryotischen und eukaryotischen Organismen weitgehend gleich ist und Puromycin so die Proteinbiosynthese an 70S und 80S Ribosomen in gleicher Weise hemmt (WHITE und WHITE, 1964).

Puromycin wirkt mehr bakteriostatisch als bakterizid, da durch die Hemmung der Proteinbiosynthese vor allem erst das Zellwachstum gehemmt wird. Erst bei längerer Einwirkung kommt es durch Sekundäreffekte zum Zelltod.

Die Hemmung der Proteinbiosynthese durch Puromycin ist reversibel. Hemmt man die Proteinbiosynthese vollständig, und setzt dann Puromycin ab, so ist nach ca. 30 min. die Synthese wieder voll in Gang (10^{-4} M Puromycin in HeLa Zellen) (WHEELOCK, 1962).

Einen auf den ersten Blick unverständlichen Zusammenhang zwischen Puromycinkonzentration und bakterizider bzw. bakteriostatischer Wirkung fanden KAMMEN et al. (1966) bei Versuchen über Transformation in *B. subtilis*. Steigende Konzentrationen von Puromycin von 5 - 30 $\mu\text{g/ml}$ brachten eine ständig wachsende Rate von Zelltod, die bei 30 $\mu\text{g/ml}$ maximale Werte erreichte. Größere Konzentrationen von Puromycin waren weniger bakterizid, bei 100 - 200 $\mu\text{g/ml}$ war die Wirkung nur bakteriostatisch. Man versucht dies damit zu erklären, daß bei niedriger Puromycinkonzentration längere Peptidketten gebildet werden, die für die Zelle schädlicher sein können als die kürzeren Ketten, die bei hoher Konzentration gebildet werden (NATHANS, 1967). Außerdem gehen durch die Bildung längerer Peptidketten dem Pool freier Aminosäuren mehr Aminosäuren ver-

loren. Die Proteinbiosynthese ist bei einer Konzentration von 100 - 200 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin zu über 90 % gehemmt; beim Maximum des letalen Effekts (30 $\mu\text{g/ml}$), bei dem die Proteinbiosynthese nur unvollständig gehemmt ist, läuft die RNA-Synthese weiter. Eventuell ist ein daraus resultierendes Ungleichgewicht der Protein- und RNA-Synthese Ursache der bakteriziden Wirkung.

Die Dosis letalis₅₀ liegt bei Mäusen bei 350 mg/kg Körpergewicht bei intravenöser Injektion oder 580 mg/kg Körpergewicht bei intraperitonealer Injektion.

Spritzt man Ratten 25 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal, so erzeugt man schon bei dieser Konzentration Gewichtsverlust und Müdigkeit, bei 100 mg/kg Körpergewicht kommt es zu Nierenschäden mit Proteinurie, Hypoalbuminämie, Hypercholesterinämie, Ödemen und Ascites und außerdem zu Knochenschäden (FRENK et al., 1955; BOROWSKY et al., 1958; FIEGELSON et al., 1957; WILSON et al., 1958). Beim Menschen erzeugt Puromycin Kopfschmerzen, Schwindel, Erbrechen und Durchfall.

Nur am Rande sei hier erwähnt, daß Puromycin den Einbau aller Aminoacyl-tRNAs gleichermaßen hemmt und keine Aminosäure bevorzugt (NATHANS und NEIDLE, 1963).

Wachstumshemmung

Puromycin hat ein sehr breites Wirkungsspektrum. Es reicht von Bakterien und anderen Mikroorganismen bis zu höheren Tieren und zum Menschen. Dabei ergeben sich nicht einmal allzugroße Unterschiede in der zur Hemmung nötigen Dosis.

Sensitivity of various organisms or cells to puromycin

	Conc. for complete inhibition (mMolar)
<i>Bacteria</i> ¹	
<i>Escherichia coli</i>	0.4
<i>Salmonella typhosa</i>	0.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.01
<i>Bacillus subtilis</i>	0.015
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.015
<i>Sarcina lutea</i>	0.004
<i>Mycobacterium</i> No. 607	0.08
<i>Protozoa</i>	
<i>Tetrahymena pyriformis</i> ²	0.01
<i>Mammals</i>	
Mouse	1.1 mMole/kg ³
HeLa cells	0.1 mMolar ⁴

(aus: NATHANS (1967), S. 260)

Auch scheint die Wirkung des Puromycin auf die Proteinbiosynthese bei verschiedenen Konzentrationen weitgehend die gleiche zu sein. Interessanterweise sind gram-positive Bakterien empfindlicher gegen Puromycin als gram-negative. Da jedoch in zellfreien Systemen aus diesen Keimgruppen die Hemmkonzentrationen nicht so unterschiedlich sind, scheint dieser Effekt auf schlechterer Resorption von Puromycin durch die Zellwand oder Membran der gram-negativen Bakterien zu beruhen.

Die Hemmwirkung von Puromycin wurde außer bei Bakterien auch untersucht bei *Trypanosoma equiperdum*, *Entamoeba histolytica*, Oxyuren, Glioblastom, im Hühnerembryo, Mammaadenocarcinomen bei Mäusen, bei Viren und HeLa-Zellen (HEWITT et al., 1954/1955).

Hemmung der Makromolekülsynthese

1955 beobachtete CREASER erstmals die Hemmwirkung von Puromycin auf die Enzymsynthese.

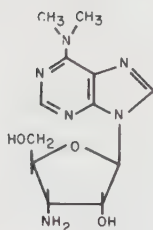
TAKEDA zeigte 1960 die besondere Empfindlichkeit der Proteinbiosynthese für Puromycin in *Pseudomonas fluorescens*. Messungen der Gesamtprotein-, der RNA- und DNA-Synthese ergaben, daß die Proteinbiosynthese sofort nach Zugabe von Puromycin gehemmt wird, während DNA- und RNA-Synthese eine zeitlang bei beinahe normalen Werten weiterlaufen (s.S. 52). Als Folge dieses Ungleichgewichts zwischen RNA- und Proteinbiosynthese ergibt sich eine Anhäufung von ungewöhnlich RNA-reichen Nukleoproteinpartikeln (NAKADA, 1965).

Die oben angesprochene besondere Empfindlichkeit der Synthese von aktivem Enzym in Bakterien kann inzwischen auf die Peptidketten-freisetzende Wirkung von Puromycin zurückgeführt werden. Enzyme werden nämlich sehr schnell inaktiv, fehlt ihnen auch nur ein kurzes Stück der Peptidkette. Trotzdem können dabei die Ketten lang genug sein, um säurefällbar zu sein, und so bei der Messung des Gesamtproteins eine nur unwesentlich verminderte Syntheserate vortäuschen.

Wie schon erwähnt, ist die Hemmung durch Puromycin reversibel. Bei HeLa-Zellen wird ca. 30 min. nach Weglassen von Puromycin wieder Protein gebildet (WHEELLOCK, 1962)

In HeLa-Zellen fand man gleichzeitig eine Verminderung der RNA-Synthese (HOLLAND, 1963; TAMAOKI und MUELLER, 1963). Ob dies auf eine direkte Wirkung von Puromycin oder indirekt auf die Hemmung der Proteinbiosynthese zurückzuführen ist, ist noch unklar. Möglicherweise wird Puromycin in den Zellen hydrolytisch gespalten, wobei das Aminonukleosid frei wird, von dem man weiß, daß es

die RNA- und besonders die rRNA-Synthese hemmt (FARNHAM, 1965; FARNHAM und DUBIN, 1965; STUDZINSKI et al., 1965). LEWIN und MOSCARELLO berichteten 1968 über vollständige Hemmung der RNA-Synthese durch Aminonukleosid ohne Hemmung der Proteinbiosynthese, die zu Segmentierung und Verklumpung der Nukleoli führte.



Structure of PAN (6-N-dimethyl-3'-amino-3'-deoxyadenosine)

Puromycin-Aminonukleosid

(aus: FARNHAM und DUBIN, S. 36)

Die Hemmung der DNA-Synthese in HeLa-Zellen beruht anscheinend als Sekundärwirkung auf der Hemmung der Proteinbiosynthese (MUELLER et al., 1962).

Wirkung auf den Nukleotidstoffwechsel

Als Adenosinanalogen kann Puromycin oder sein Aminonukleosid in den Nukleotidstoffwechsel eingreifen. Die Beurteilung der Versuche auf diesem Gebiet ist dadurch erschwert, da die meisten Versuche in intakten Zellen vorgenommen wurden, wobei eine Unterscheidung zwischen direkter und indirekter Wirkung oft nicht leicht ist.

Puromycin und Puromycin-Aminonukleosid sind antibiotisch aktiv, haben jedoch unterschiedliche Wirkungen. Das Aminonukleosid scheint die Synthese von Nukleotiden zu beeinflussen. In manchen Organismen, z.B. *Trypanosoma equi-*

perdum (AGOSIN und v.BRAND, 1954; HEWITT et al., 1954) hemmt das Aminonukleosid das Wachstum stärker als Puromycin.

BORTLE und OLESON konnten 1954 zeigen, daß die Wachstumshemmung durch niedrige Dosen von Puromycin bei dem Protozoon *Tetrahymena piriformis*, das auf Zufuhr von Guanotin, Guanin oder Guanylsäure angewiesen ist, durch Zugabe von Guanylsäure aufhebbar ist. Es ist jedoch nicht klar, ob Puromycin oder Aminonukleosid einen direkten Einfluß auf die Guanylsäuresynthese haben.

Ähnliche Aufhebung der Puromycin/Aminonukleosidwirkung stellten DICKIE et al. (1965) in *E.coli* nach Zugabe von Adenin zum Medium fest. Als sie feststellten, daß eine Permeationsbarriere den Eintritt des Aminonukleosids in log-Phasen-Zellen verhinderte, verwendeten sie osmotisch aktive Sphäroblasten. In diesem System wirkte das Aminonukleosid auf die Verwertung von Vorstufen der Purinsynthese. Es scheint sich dabei um eine 'feedback'-Hemmung der Purinbiosynthese zu handeln. Diese Hemmung der de novo Synthese führte über eine Begrenzung des Purinkörperangebots auch zu einer Hemmung der DNA-Synthese, wobei das Aminonukleotid selbst nicht als Ersatz eingebaut werden konnte. Eine Hemmung der Proteinbiosynthese trat dabei nicht auf.

Die Verwertung von exogen zugeführtem Adenosin in Mäuse-Fibroblasten wird gleichstark wie die von Uridin gehemmt. Daher wird eine direkte Wirkung auf die de novo Synthese von Purinkörpern fraglich (FARNHAM und DUBIN, 1967). Ein Teil des Aminonukleosids wird in den Fibroblasten demethyliert und anschließend phosphoryliert. Über die Wirkung dieses Produkts hat man jedoch noch keine klaren Vorstellungen.

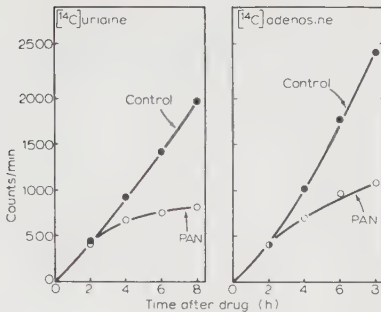
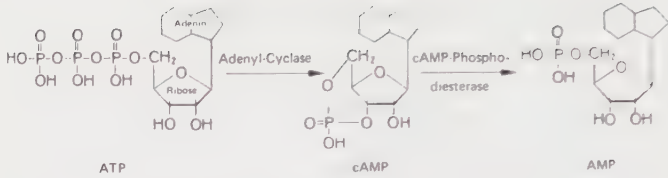


Fig. 3. A comparison of the effects of PAN on the incorporation of [^{14}C]uridine and [^{14}C]adenosine in L cells. Two flasks, with or without PAN, containing [^{14}C]uridine ($0.02\ \mu\text{C}/\text{ml}$ and $3\ \mu\text{g}/\text{ml}$) and $3\ \mu\text{g}/\text{ml}$ unlabeled adenosine in Eagle's minimum essential medium and two flasks, with or without PAN, containing [^{14}C]adenosine ($0.02\ \mu\text{C}/\text{ml}$ and $3\ \mu\text{g}/\text{ml}$) and $3\ \mu\text{g}/\text{ml}$ unlabeled uridine in Eagle's minimum essential medium were prepared as described in Fig. 2. At zero time an equal volume of cell suspension was added to each flask giving a final cell density of approx. $4 \cdot 10^5$ cells per ml. These flasks were sampled periodically thereafter as described in Fig. 1. ●—●, cells in Eagle's minimum essential medium in the absence of PAN; ○—○, cells in the same medium but containing 10^{-4}M PAN.

(aus: FARNHAM und DUBIN (1967), S. 41)

Die in diesem Artikel formulierte besondere Empfindlichkeit der rRNA-Synthese für das Aminonukleosid ließ sich in Untersuchungen von TAYLOR und STANNERS (1968) in Kulturen von Hamsterembryozellen nicht nachweisen. Hier wurden alle RNA-Typen gleichermaßen gehemmt. Jedoch ist nicht auszuschließen, daß das Aminonukleosid die "Reifung" der rRNA und ihren Einbau in die Ribosomen stört und so zu einem vermehrten bzw. frühzeitigen Abbau beiträgt.

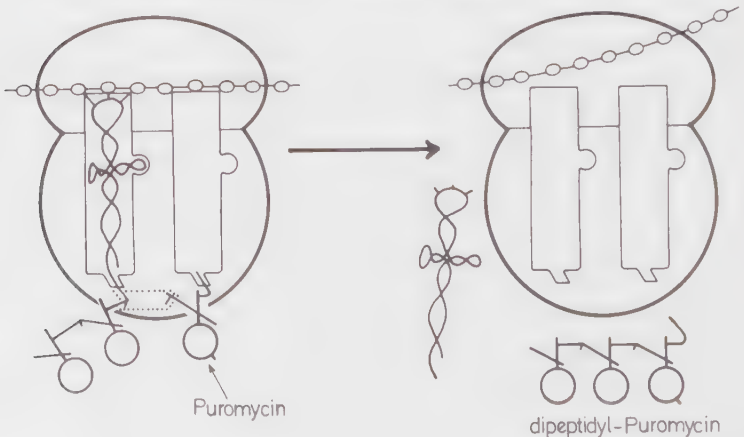
Einen direkten Einfluß auf den Nukleotidstoffwechsel konnte man aber beim glykogenolytischen Effekt von Puromycin (HOFERT et al., 1962) zeigen: Der plötzliche Abfall des Leberglykogenspiegels bei Mäusen nach einer einmaligen Gabe von Puromycin fällt nicht mit der Hemmung der Proteinbiosynthese zusammen (HOFERT und BOUTWELL, 1963); vielmehr behindert Puromycin den Abbau des cyclischen 3'5'-AMP durch kompetitive Hemmung der 3'5'-AMP-Phosphodiesterase. Diese Behinderung wirkt sich wie eine Aktivierung der Glykogenphosphorylase aus, was zu einem raschen Abbau von Glykogen führt (APPLEMAN und KEMP, 1966).



(aus: BOSCH, S. 307)

Wirkungsmechanismus

Die Wirkung von Puromycin lässt sich weitgehend so erklären: Nach der Translokation der mit der soeben verlängerten Peptidkette beladenen tRNA von der A- in die P-Seite hat Puromycin jetzt die Möglichkeit, die dabei freige-wordene A-Seite zu besetzen. Es kann sich am 50S Ribosom anheften, da es durch seine ähnliche Struktur mit dem CCA-Ende der tRNA verwechselt wird. Beim nächsten Schritt der Elongation, dem Peptid-Transfer, wird die Peptidkette der Peptidyl-tRNA in der P-Seite auf die freie Aminogruppe des Puromycins übertragen, da dessen Aminosäureseitenkette als Acylrest einer Aminoacyl-tRNA behandelt wird. Dadurch hängt in der A-Seite nun ein Peptidyl-Puromycin. Dieses wird spontan vom Ribosom freigesetzt, da es keine genügend starke Bindung eingehen kann.



Puromycin bricht also das Wachstum der Peptidkette an irgendeiner Stelle ab, indem es die bis dahin gebildete Kette auf sich übertragen läßt. Vom Molekül her ist eine Verlängerung der Kette an der Carboxylseite des Acylrestes von Puromycin nicht möglich, da keine spaltbare Esterbindung zum Nukleosid besteht.

Bis der hier vorgestellte Wirkungsmechanismus vor einigen Jahren allgemein anerkannt wurde, war eine große Anzahl von Versuchen mit Puromycin nötig. Anhand einer Reihe der wichtigsten Versuche soll gezeigt werden, wie der Wirkungsmechanismus Stück für Stück aufgeklärt wurde.

CREASER setzte 1955 Stämmen von *Staphylococcus aureus* Puromycin zu und beobachtete die Synthese von β -Galaktosidase. Er stellte fest, daß bei der Minimalkonzentration, die das Wachstum der Zellen gerade vollständig hemmte ($10 \mu\text{g/ml}$), die Synthese von β -Galaktosidase zu 98 % gehemmt wurde. Dies deutete schon auf eine Wirkung von Puromycin auf die Proteinbiosynthese hin. Während CREASER Puromycin nur neben vielen anderen Antibiotika untersuchte, versuchten YARMOLINSKY und DE LA HABA (1959) genauer, den direkten Wirkungsort zu erforschen. Sie fanden, daß Puromycin den Einbau von Aminosäuren in Protein hemmt.

¹⁴C-Leucin wurde in Anwesenheit von Puromycin nicht mehr oder nur in stark vermindertem Umfang von Leucin-tRNA auf das Peptid übertragen und somit das Wachstum der Peptidkette gehemmt. Dies war schon bei $5 \text{ m}\mu\text{M}$ zu 50 % der Fall. YARMOLINSKY und DE LA HABA (1959) äußerten auch als erste die Vermutung, daß Puromycin aufgrund seiner Ähnlichkeit mit dem 3'-terminalen Ende der tRNA in der Zelle wirkt. Im Jahre 1958 war von verschiedenen Arbeitsgruppen als letztes Nukleotid in der tRNA Adenosin und als vorletztes Cytidin erkannt worden. Auf dem Gedanken der Ähnlichkeit in Bindungen und Struktur zwischen CCA-Ende der tRNA und Puromycin bauten fast alle nachfolgenden Untersuchungen auf.

Um zu zeigen, ob Puromycin die Proteinbiosynthese oder auch die DNA- und RNA-Synthese hemmt, untersuchte TAKEDA (1960) die Mengenzunahme von Protein und Nukleinsäuren in *Pseudomonas fluorescens*. Er fand, daß mit Puromycin die Proteinmenge 5 Stunden konstant blieb, während in dieser Zeit die RNA-Menge verdreifacht und die DNA verdoppelt wurde. Das ist zwar weniger als bei der Kontrolle ohne Puromycin, deutet aber klar auf eine primäre Wirkung auf die Proteinbiosynthese und auf eine schwächere auf DNA- und RNA-Synthese hin, falls sich diese geringe Hemmung nicht sowieso nur als sekundärer Effekt infolge Enzymmangels im Nukleinsäuresynthesystem erklären läßt.

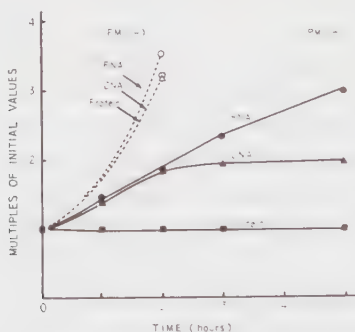


FIG. 3. Changes in protein, RNA and DNA during puromycin treatment. Exponential growth phase cells of *Pseudomonas fluorescens*, strain A₃₋₁₂, were incubated at 25° in medium B in the presence (50 µg. per ml.) or absence of puromycin (PM). At intervals aliquots were taken from the culture and analyzed for protein, RNA and DNA as described in the text. The results are plotted as multiples of the initial values.

(aus: TAKEDA, S. 172)

RABINOWITZ und FISHER untersuchten 1960 Proteine in Ehrlich Ascites Tumorzellen und Kaninchen-Retikulozyten in vitro nach Zugabe von Puromycin und radioaktiv markierten Aminosäuren in geringen Konzentrationen. Sie stellten fest, daß die Ribosomen in Anwesenheit von Puromycin wesentlich weniger markierte Proteine gebunden hatten (in der Arbeit noch als ribosomale Proteine bezeichnet), während lösliches (kurzkettiges) Protein über längere Zeit in der Menge nahezu konstant blieb.

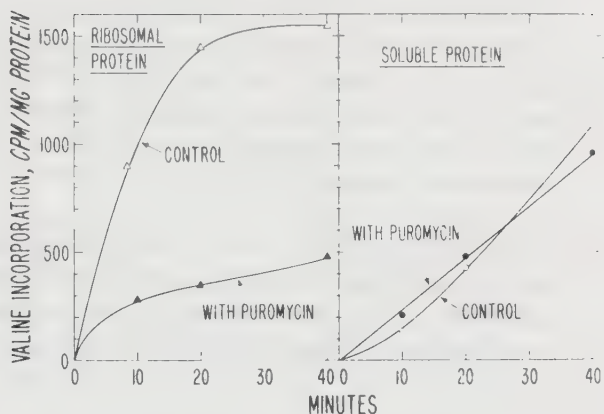


FIG. 3. Kinetics of dissociation of labeling of soluble protein from ribosomal protein at 22°. Ehrlich ascites cells (2 ml) were incubated in 6 ml of buffer with L-valine- C^{14} , 50 μ moles, 1.9×10^5 c.p.m. Puromycin, when added, was at a concentration 5×10^{-6} M.

(aus: RABINOWITZ und FISHER, S. 478)

Qualitativ waren diese löslichen Proteine jedoch nicht gleich wie die, die ohne Puromycin synthetisiert wurden. Puromycin hemmte den Einbau von Aminosäuren in Protein schon bei Konzentrationen, die zu niedrig waren, als daß sie die Markierung des Gesamtproteins hemmen konnten. RABINOWITZ und FISHER erklärten dies mit der dauernden vorzeitigen Freisetzung von Protein von der Synthesestelle des Ribosoms.

Die Ergebnisse von YARMOLINSKY und DE LA HABA bestätigten NATHANS und LIPMANN (1961) im zellfreien E.coli-System: Der Einbau von Aminosäuren in Peptid wurde gehemmt; die vorher an tRNA gebundenen Aminosäuren fanden sich gehäuft in einem Gemisch löslicher kurzkettiger Peptide.

In Retikulozyten von Kaninchen untersuchten MORRIS und SCHWEET (1961) die nicht-enzymatische Freisetzung von löslichen mit ^{14}C markierten Proteinen von Ribosomen. Sie konnten zeigen, daß Puromycin durch seine Wirkung am Ribosom die Proteinbiosynthese hemmt und die hierbei untersuchte Globinkette auf spezifische Weise vom Ribosom verdrängt.

Ebenfalls mit Kaninchen-Retikulozyten arbeiteten 1962 ALLEN und ZAMECNIK. Sie verwendeten radioaktiv markiertes Puromycin. Dieses wurde in Peptide eingebaut und konnte davon nicht mehr abgetrennt werden, weder durch Säuren, Lösungsmittel oder durch Fällung.

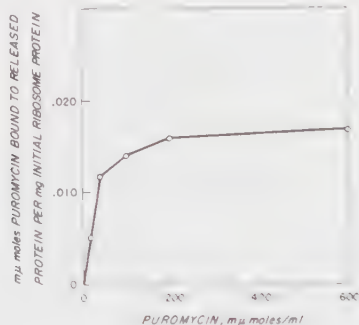


Fig. 5. The binding of $[^{14}\text{C}]$ puromycin by released polypeptides. Ribosomes, in final concentration of 5 mg/ml ribosome protein were incubated for 10 min at 37° in Medium A, pH 7.0, with varying concentrations of $[^{14}\text{C}]$ puromycin. The ribosomes were then precipitated by the addition of acetate buffer at 0, pH 5.1, and centrifuged down. Carrier protein was added to the supernatant-released polypeptides prior to washing. Since the amount of released polypeptides cannot be measured gravimetrically, the bound puromycin is expressed in terms of initial ribosome protein.

(aus: ALLEN und ZAMECNIK, S. 872)

Das Aminoende der Puromycin-Seitenkette war nicht mehr frei (Dinitrophenyl konnte nicht mehr angreifen), ebenso die C-terminale Carboxylgruppe des Peptids. Daraus schlossen sie auf eine Peptidbindung zwischen Peptid und Puromycin. Puromycin wirkte also als Akzeptor der Peptidkette und verdrängte die tRNA, über die das Peptid ans Ribosom gebunden ist. Diese Verdrängung vollzog sich

ohne ATP und andere Faktoren in 1 - 2 min. Für die Freisetzung der Globinkette durch Puromycin war es nicht nötig, daß diese komplett war; es wurden sogar nur Bruchstücke frei, die aber alle N-terminal Valin hatten. Da das C-terminale Ende des Peptids durch Puromycin besetzt ist, ergibt sich das Verhältnis von 1 Puromycin : 1 Valin oder 1 Puromycin : 1 Peptid. Diese Ergebnisse stimmen überein mit denen von MORRIS et al. (1962), die, ebenfalls in Retikulozyten, Ribosomen in vivo mit ^{14}C Valin markierten und am N-terminalen Ende der Globinketten markiertes Valin isolieren konnten. Mit Puromycin wurden vom Ribosom inkomplette Globinketten freigesetzt; es entstand markiertes lösliches Peptid, das aus sonst unlöslichem Protein stammt. Wurde Puromycin aus dem Ansatz ausgewaschen, so funktionierte nach einiger Zeit die Globinsynthese wieder. Diese Reversibilität spricht gegen einen Mechanismus wie Ribosomen-Dissoziation oder Abspaltung einer essentiellen Komponente vom Ribosom.

In einer im gleichen Jahr erschienenen Arbeit weisen ALLEN und SCHWEET (1962) darauf hin, daß die Hemmung des Einbaus markierter Aminosäuren in Protein durch Puromycin nicht abnimmt durch vermehrte Zugabe von GTP oder tRNA; die Hemmung war sogar gleich in An- oder Abwesenheit von tRNA. Dies zeigt eine direkte Wirkung von Puromycin auf das Ribosom. Die Ergebnisse wurden später bestätigt durch COUTSOGEOGOPOULOS (1967) (s.S. 71)

NATHANS und NEIDLE zeigten 1963, daß Puromycin nicht aminosäurespezifisch wirkt, indem sie verschiedene Peptide (poly-lys und poly-phe) synthetisieren ließen und dann den Grad der Hemmung durch Puromycin maßen. Die Puromycinwirkung war jeweils gleich. NATHANS et al. (63) beschrieben im gleichen Jahr im poly U/poly phe System eine Abnahme der TCA-fällbaren Peptide und eine Zunahme der kurzen säure- und alkohollöslichen Peptide nach Zusetzen von Puromycin.

Das gleiche zeigten MORRIS et al. (1963) im Globinsynthesystem in Retikulozyten: Abfall der Menge der TCA-fällbaren Peptide. Die Peptide, die wiederum 1 Puromycin : 1 Valin haben, haben alle die gleiche Aminosäuresequenz am Anfang. Da die Kettenlänge nur sehr gering war, fanden sich die Peptidyl-Puromycin-Moleküle im Überstand nach hochtouriger Ultrazentrifugation.

Ungefähr ein Viertel der entstandenen Peptidketten waren nach Zugabe von Puromycin neu begonnen worden. Diese Ketten waren deutlich kürzer als diejenigen, die vor Zugabe von Puromycin unbeeinflusst synthetisiert worden waren. Die Freisetzung der Peptidketten vom Ribosom war bei 4°C ohne Enzyme und Faktoren möglich.

GILBERT fand 1963 im zellfreien System aus E.coli, das poly Phe an poly U synthetisierte, daß die Peptidyl-tRNA an das 50S Ribosom assoziiert ist, und daß Puromycin durch die Reaktion mit der Esterbindung zwischen der Carboxylgruppe des Peptids und der Hydroxylgruppe des Adenosinendes der tRNA die Polypeptidkette freisetzt. Diese Spaltung läßt sich gut zeigen (s.Abb.) durch Vergleich eines Proteinbiosynthese-Ansatzes, der nach Vorinkubation mit RNase behandelt wird (a), und einem, zu dem Puromycin zugegeben wird (b). In beiden Fällen tritt eine Spaltung des tRNA-Gipfels (O.D.) und des Phenylalanin-Gipfels (cts/min) auf. Die Bindung von tRNA und Peptid ist also aufgehoben.

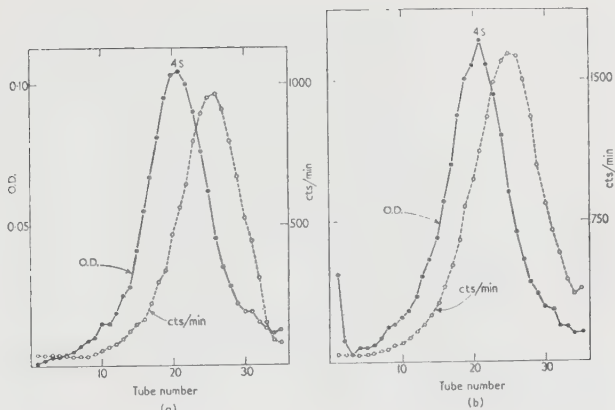


FIG. 4. The sedimentation of the polypeptide chain after RNase treatment or after puromycin

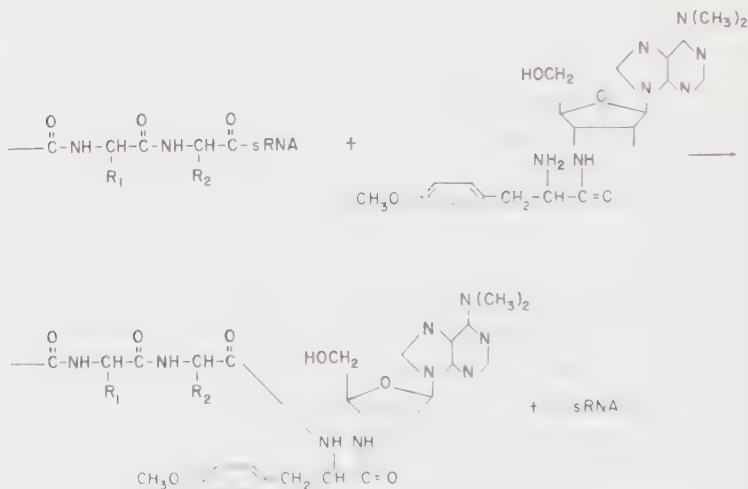
(aus: GILBERT, S. 393)

Mögliche andere Angriffspunkte von Puromycin schloß SPYRIDES (1964) durch Untersuchung der Bindung von mRNA und Aminoacyl-tRNA an Ribosomen aus. Er fand, daß Puromycin keinen Einfluß auf diese Bindung hat.

Die Art der Bindung zwischen Puromycin und der Peptidkette untersuchte NATHANS (1964) genauer. Er setzte radioaktiv markiertes Puromycin Kulturen von E.coli zu, und isolierte daraus radioaktives Material in säurefällbaren Produkten. Der Einbau des radioaktiven Puromycins in Protein war, wie der von Aminosäuren, durch Chloramphenicol hemmbar. Abbauprobversuche der Peptidketten mit verschiedenen Enzymen führte zu folgenden Ergebnissen: Die radioaktiv markierte Gruppe war fester Bestandteil der Peptidkette; O-Methyl-Tyrosin, der Aminosäureanteil von Puromycin, ist nicht als solcher am Carboxylende der Peptidkette und wird auch nicht als freie Aminosäure eingebaut. Wurde das radioaktive, säurefällbare Produkt mit Trypsin oder Chymotrypsin oder noch besser mit beiden behandelt, traten Gruppen auf, die sich chromatographisch gleich wie Puromycin verhielten. Da kein Aminonukleosid

frei wurde, scheint die Amidbindung in Puromycin resistent gegen Chymotrypsin zu sein.

Um sicher zu gehen, daß keine anderen Verbindungen vorlagen, benutzte NATHANS bei diesen Versuchen auch künstlich synthetisiertes Aminoacyl-Puromycin. Schließlich wurde das gereinigte, radioaktiv markierte Material zusammen mit reinem Puromycin kristallisiert, um die Reinheit der durch enzymatischen Abbau von Peptidyl-Puromycin gewonnenen Bestandteile zu erhärten.-Aus dieser Art der Puromycin-Wirkung, daß nämlich das Peptid von der Peptidyl-tRNA auf Puromycin übertragen wird, folgerte NATHANS, daß diese Reaktion als Modell für die Bildung der Peptidbindung in der Proteinsynthese dienen kann.



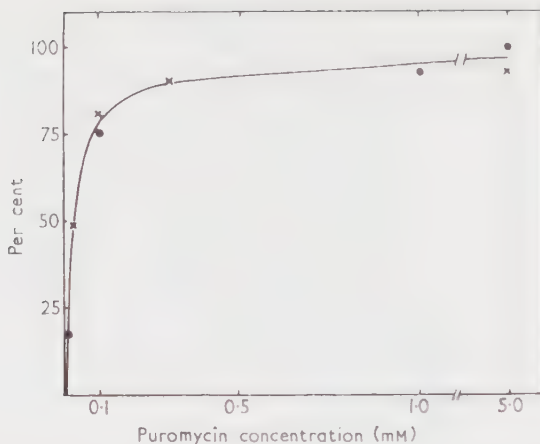
Übertragung von Peptidketten von tRNA auf Puromycin
(aus: NATHANS (1964), S. 591)

Eine gute Zusammenfassung der Ergebnisse der Puromycin-Forschung gaben TRAUT und MONRO in einem Artikel aus dem Jahre 1964: Der Angriffspunkt der Hemmung der Proteinsynthese sei im Stadium des Kettenwachstums durch Sub-

stitution von Puromycin für die nächste Aminosäure zu suchen; folgende Punkte wiesen deutlich darauf hin:

- (1) Die chemische Analogie zwischen Puromycin und dem terminalen Aminoacyl-Adenosin der Aminoacyl-tRNA (YARMOLINSKY und DE LA HABA, 1959);
- (2) die Freisetzung der wachsenden Peptidkette von Ribosom und tRNA durch Puromycin (MORRIS und SCHWEET, 1961; GILBERT, 1963);
- (3) die Anheftung von Puromycin an die freigesetzte Globinkette (ALLEN und ZAMECNIK, 1962);
- (4) die C-terminale Anheftung von Puromycin an Peptide während der in vivo Inkubation von E.coli mit Puromycin (NATHANS, 1964);
- (5) die Anheftung von Puromycin an Lysin-Peptide aus Polylysyl-tRNA (SMITH et al., 1965).

Die Peptidbindung zu Puromycin findet statt ohne die normalerweise begleitenden Wechselwirkungen von tRNA mit Ribosom und mRNA, und wenn diese Anheftungspunkte über das Polynukleotid verloren gegangen sind, wird die wachsende Peptidkette freigesetzt. Die Puromycin-Reaktion ist also eine vereinfachte Analogie des Kettenwachstums. In ihren Versuchen untersuchten TRAUT und MONRO die Abhängigkeit der Puromycin-Reaktion von der Zugabe von 100 000 g Überstand (der die Faktoren und Enzyme enthält) und GTP. Im kompletten System erreicht die Freisetzung der Peptidkette die 100 % Marke;



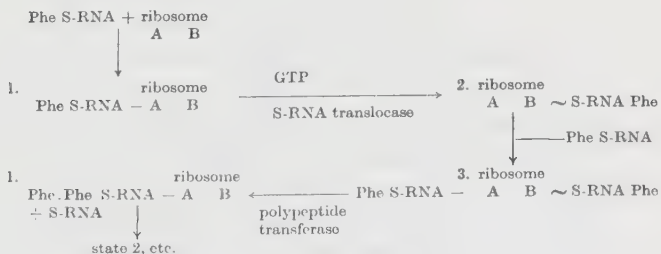
Wirkung der Puromycinkonzentration auf die
Synthese von Polyphenylalanin und auf die
Freisetzung von tRNA

(aus: TRAUT und MONRO, S. 66)

ohne Überstand und GTP endet die Reaktion, nachdem nur ein Teil der Peptidkette freigesetzt ist. Gibt man GTP und Überstand zu, nachdem die Freisetzungskurve dieses erste Plateau erreicht hat, läuft die Reaktion bis zur Vollständigkeit ab. Es sieht also so aus, als ob der Peptidyl-tRNA-Ribosomen-Komplex in 2 Typen vorliegen kann, von denen nur einer für die Puromycinwirkung die Zugabe von Überstandsfaktoren und GTP erfordert.

Die Funktion der Ribosomen in der Puromycin-Reaktion war die nächste Frage in TRAUT und MONROs Versuchen. Da die Inkubation von Aminoacyl-tRNA mit Puromycin, Überstand und GTP nicht zu einer Freisetzung führte, es sei denn, man gab auch Ribosomen dazu, mußte die beladene tRNA in besonderer Weise ans Ribosom assoziiert werden, um mit Puromycin reagieren zu können. TRAUT und MONRO machten sich die Beobachtung von GILBERT (1963) zunutze, daß ein Peptid an 50S hängen bleibt, wenn man durch nie-

drige Magnesiumionenkonzentration 30S und 50S Ribosomen-untereinheiten trennt. Sie isolierten beladene 50S Ribosomen und inkubierten sie mit Puromycin: 60 % der Ketten wurden freigesetzt. Die Puromycinreaktion funktioniert also auch ohne 30S und die daran gebundene mRNA. Aus diesen Ergebnissen folgerten sie, daß Überstand und GTP nötig seien, den reaktionsfähigen Peptidyl-tRNA-Ribosomen-Komplex zu bilden, und daß die Peptidbindung durch das 50S Ribosom selbst gebildet wird. Zusammen mit der Beobachtung von SCHWEET und Mitarbeitern (ARLINGHAUS et al., 1964), daß ein Ribosom zwei beladene tRNAs binden kann, und einem Schema von WATSON (1963), in dem beschrieben wird, daß eine Peptidyl-tRNA den Ort P am Ribosom nur durch Translokation von einem Ort A abhängig von GTP und Überstand erreichen kann, ergab sich die Schlußfolgerung: Ribosomen mit Aminoacyl-tRNA in der A-Seite brauchen zur Reaktion mit Puromycin GTP und Überstand, Ribosomen mit Aminoacyl-tRNA oder Peptidyl-tRNA in der P-Seite nur das Peptidbindungsenzym, welches eventuell an das 50S Ribosom gebunden ist.



(aus: TRAUT und MONRO, S. 71)

Versuche von TAKANAMI (1964) brachten ergänzend zur Wirkung von Puromycin Kenntnis über eine allgemeine Wirkungsweise von AA-tRNA-Analogen. Er behandelte Aminoacyl-tRNA mit T_I -Ribonuklease und erhielt dadurch Oligonukleotide mit Kettenlängen von ca. 6 Nukleotiden mit angekoppelter Aminosäure. In einem zellfreien System mit künstlichem poly UC - als messenger-RNA - wurden durch Vorinkubation

entstandene Peptidketten auf die tRNA-Fragmente übertragen und, wie durch Puromycin, durch und mit dem Fragment freigesetzt.

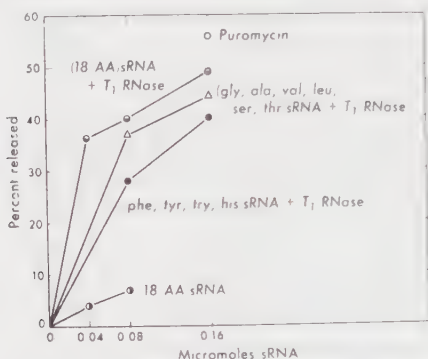


FIG. 2.—Release of nascent peptide chains from ribosomes by T1-RNase digests of aminoacyl-sRNA.

(aus: TAKANAMI, S. 1274)

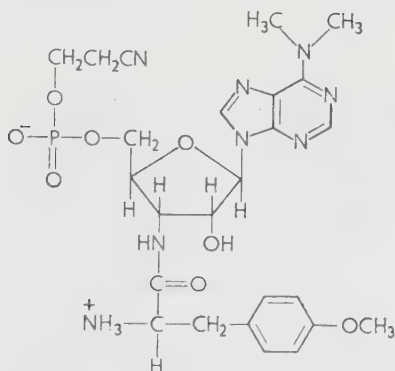
Welche Aminosäure dabei an dem Oligonukleotid angeheftet ist, spielt kaum eine Rolle, im Gegensatz zu Puromycin, das nur mit aromatischen Aminosäuren aktiv ist. Die Oligonukleotide haben jedoch am vorletzten Nukleotid immer den Cytidylrest, den Puromycin eventuell mit der aromatischen Aminosäure imitiert (SYMONS et al., 1969). Versuche mit Modellen zeigten, daß die Aminosäure im Puromycin und die vorletzte Cytidylgruppe die gleiche Position einnehmen können.

WALLER et al. (1966) konnten zeigen, daß auch Aminoacyl-Adenosin Peptidketten vom Ribosom freisetzen kann. Dabei haben Moleküle mit einem aromatischen Aminoacylrest eine stärkere Hemmwirkung als solche mit aliphatischen Resten.

Aus der Möglichkeit, Bruchstücke von Aminoacyl-tRNA einzusetzen, und der Beobachtung von TRAUT und MONRO (1964), daß eine Peptidbindung auch ohne mRNA und 30S synthetisiert werden kann, entstand die "fragment reaction", die später zu besprechen ist.

In Fortsetzung der geschilderten Arbeit von TRAUT und MONRO (1964) berichtet ein Artikel von SMITH et al. (1965) über die Wirkung von Puromycin auf ein poly-Lys an poly A synthetisierendes System aus E. coli B. Aufgabe der Arbeit war es zu zeigen, daß jedes Peptid ein Puromycinmolekül gebunden hat, und daß Puromycin nur auf diese Weise Peptidketten freisetzen kann. Befunde, daß in Gegenwart von Puromycin auch lösliche Peptide ohne daran gebundenes Puromycin entstünden (NATHANS et al., 1963; MORRIS et al., 1963), ließen nach Überprüfung nur die Erklärung zu, daß Puromycin nach der Freisetzung des Peptids enzymatisch abgetrennt wurde.

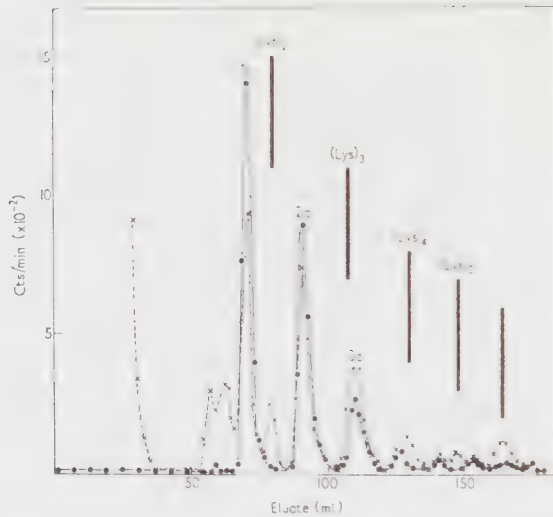
Bei diesen Versuchen wurde das aminosäureeinbauende System mit ^3H -Lysin und poly A inkubiert. Kurz darauf wurde ein ^{32}P -Puromycinderivat (Puromycin-5'- β -Cyanoäthylphosphat)



Structure of puromycin 5'- β -cyanoethyl phosphate.

(aus: SMITH et al., S. 618)

zugegeben. Die freigesetzten Peptide wurde chromatographisch getrennt. Das Elutionsmuster zeigt je einen Gipfel von ^{32}P über jedem von ^3H , was bedeutet, daß mit jedem Lysylpeptid ein Puromycin gekoppelt ist.



(aus: SMITH et al., S. 624)

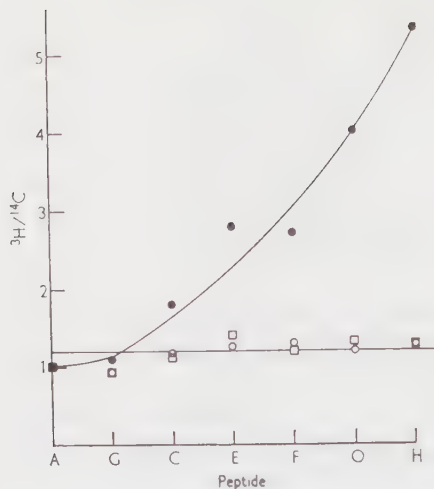
Trennung an Cellulosephosphat von freigesetzten ^3H -markierten Lysinpeptiden, die in Anwesenheit von poly A und $(^{32}\text{P})\text{PCEP}$ gebildet wurden. Aktivität ^{32}P ●—●—●, ^3H x—x—x. Die senkrechten Linien geben die Position der markierten Lysin-Gipfel an.

Eine Ausnahme bildet der Monolysin-Gipfel, bei dem keine ^{32}P Aktivität aus Puromycin auftaucht

Diese Untersuchungen bestätigten die früheren Arbeiten von ALLEN und ZAMECNIK (1962) und NATHANS (1964), daß Puromycin durch Peptidbindung an das C-terminale Ende der freigesetzten Peptidketten gebunden ist. Weiterführend wurde hier Puromycin auch in vitro mit synthetischer mRNA gebunden, und es konnte gezeigt werden, daß jedes Peptid, das durch Puromycin freigesetzt wurde, auch ein Puromycin angehängt hat. Daß die Hydrolyse von Dilysyl-Puromycin durch Trypsin zur Entstehung von Dilysin führt,

spricht für eine Anheftung von Puromycin an die Carboxylseite des Peptids, da Trypsin an der Carboxylseite von Lysin (und Arginin) spaltet. Erstaunlicherweise fanden SMITH et al. (1965) kein Monolysyl-Puromycin; entweder liegt das an einer Besonderheit der Ketteninitiation, besonders in einem so stark vereinfachten System mit poly A als messenger, oder besonderen Umständen bei der Knüpfung der ersten Peptidbindung. Eventuell besteht ein Unterschied in den Schritten, die zur ersten und zu den folgenden Peptidbindungen führen.

Im Rahmen einer Arbeit über "Proteinsynthese an ms-2-RNA" arbeitete NATHANS (1965) auch mit Puromycin. Er entwickelte eine Methode der Sequenzanalyse von Proteinen mit Hilfe von Puromycin. Setzt man einem System aus E.coli-Extrakten und E.coli-Phagen ms-2-RNA Puromycin zu, erhält man Hüllproteinfragmente verschiedener Länge, da die Kette an vielen verschiedenen Stellen abgebrochen wird. Diese Bruchstücke sind durch Vergleich ihrer tryptischen Peptide mit denen des fertigen Proteins identifizierbar: Synthetisiert man in Gegenwart von Puromycin ^3H -markierte Peptide und als Kontrolle ohne Puromycin ^{14}C -markierte Peptide, läßt sich durch Vergleich der Mengen (Aktivitäten) der einzelnen tryptischen Peptide in Ansatz und Kontrolle aussagen, wie nahe am NH_2 -terminalen Ende das betreffende Protein zu suchen ist: Die NH_2 -nahen Bruchstücke werden mit Puromycin oft neu gestartet und kommen oft vor, während die COOH -terminalen Stücke nur selten vorkommen, da Puromycin die Kette vorher abbricht.



(aus: NATHANS (65), S. 529)

Unterschiedliche Synthese von Hüllproteinpeptiden in Anwesenheit von Puromycin, jeweils bezogen auf die Syntheserate des Peptids A als 1,0.

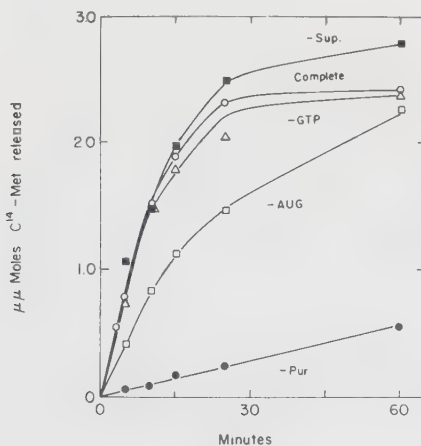
• — • — • Puromycin, ◻ — ◻ — ◻ Chloramphenicol, ◻ — ◻ — ◻ Tetracyclin.

Viele Untersuchungen der Jahre 1966 und 1967 befassen sich mit den von MONRO (67) gezeigten 2 Bindungsstellen für tRNA am Ribosom, von denen eine empfindlich für Puromycin ist, die andere nicht. Nach HEINZ et al. (1966) werden Peptide durch Puromycin nur aus der P-Seite freigesetzt, die A-Seite reagiert nicht.

BRETSCHER und MARKER untersuchten 1966 die Affinität der beiden Seiten an der 50S Untereinheit für verschiedene tRNAs. Sie fanden, daß Aminoacyl-tRNAs in der A-Seite,

die zur Initiation nötige fMet-tRNA an die P-Seite gebunden wird, und daß Puromycin nur die A-Seite besetzen kann. Die Spezifität für die Entscheidung, ob fMet-tRNA_F sich an die A- oder P-Seite bindet, liegt in der fMet-tRNA_F selbst.

ZAMIR et al. machten 1966 Versuche zur Lokalisation der Peptidyltransferase und fanden bestätigt, daß diese Bestandteil des 50S Ribosoms ist. In einem dieser Versuche wurde auch Puromycin eingesetzt: Wurde zu einem Ansatz, in dem Ribosomen mit N-Formylmethionyl-tRNA vorinkubiert waren, Puromycin zugegeben, so wurde N-Formylmethionyl-Puromycin gebildet, und zwar ohne GTP und Überstandsfaktoren. Eine Verunreinigung der Ribosomen mit ATP ist jedoch nicht auszuschließen.

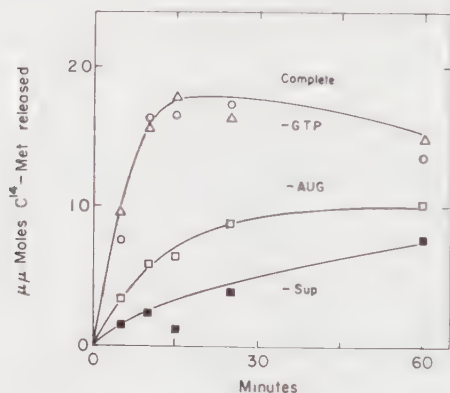


-Time course of the puromycin reaction with F-¹⁴C-met-tRNA. Complete mixture, ○; minus puromycin, ●; minus GTP, △; minus ApUpG, □; minus supernatant fraction, ■. Aliquots of 0.1-ml were assayed.

(aus: ZAMIR et al., S. 1797)

Verwendeten sie aber eine nicht formylierte Methionyl tRNA, gab es keine Reaktion mit Puromycin. Erst nach Zugabe von (GTP und) Überstandsfaktoren wurde hier Oligo-

Methionyl-Puromycin freigesetzt.

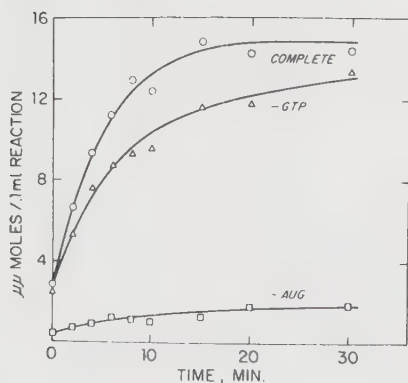


—Time course of the puromycin reaction with C^{14} -met-tRNA. See Fig. 1 for details.

(aus: ZAMIR et al., S. 1798)

Dies deutet darauf hin, daß Puromycin entweder nur mit einer in der P-Seite lokalisierten Carboxylgruppe reagieren kann, wobei angenommen wird, die fMet-tRNA gehe direkt in die P-Seite unter Umgehung der GTP-verbrauchenden Translokation, oder daß Energie nötig ist, eine nicht formylierte tRNA in einen sterischen Zustand zu verwinden, der eine Reaktion mit Puromycin ermöglicht.

Bei Versuchen von HERSHEY und THACH (1967) wurde diese GTP-Abhängigkeit nachuntersucht. Sie fanden, daß in allen Fällen GTP nötig ist, also auch für die Anheftung der N-fMet-tRNA. Das GTP hat keinen Einfluß auf die Bindung von fMet-tRNA ans Ribosom;



—Rate of binding of F-met-tRNA to ribosomes. Reaction conditions are described in *Materials and Methods*. Symbols represent: complete system (○); without GTP (△); without ApUpG (□).

(aus: HERSHEY und THACH, S. 763)

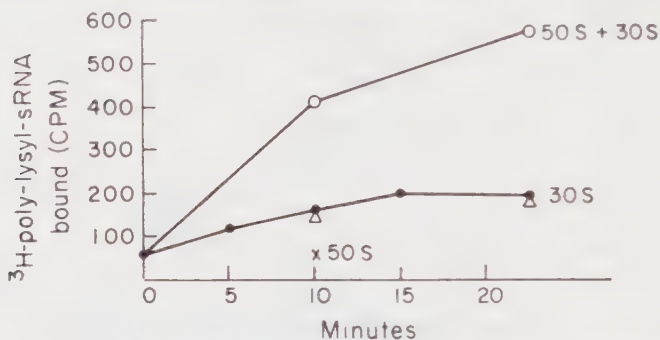
es spielt erst vor der Knüpfung der Peptidbindung eine Rolle. Das GTP analoge GMP-PCP, das nicht hydrolysierbar ist, läßt auch eine Bindung von tRNA ans Ribosom zu, erlaubt jedoch keine Reaktion der Peptidyl- bzw. fMet-tRNA mit Puromycin. GTP scheint also für Translokation oder für die Freisetzung von leerer tRNA nötig zu sein.

Nach SKOGERSON und MOLDAVE (1968) reagiert Puromycin im Rattenlebersystem mit Peptidyl-tRNA in der P-Seite ohne GTP, Transferase I und II, in der A-Seite mit GTP und Transferase II. Es war möglich, nach dem Peptidyltransfer Peptidyl-tRNA aus der A-Seite zu isolieren. HEINTZ et al. (1968) bestätigte dies in Testen im Retikulocten-Ribosomensystem.

Nach GOTTESMANN (1967) bindet sich reine poly-Lys-tRNA an Ribosomen in Gegenwart von mRNA mit drei oder mehr

Adenylyl-Resten als template. Diese Bindung geht besonders leicht und gut vor sich, wenn sowohl 30S als auch 50S Ribosomenuntereinheiten im Ansatz sind.

Reaction of Ribosome-bound Polylysyl-tRNA with Puromycin—



The binding of ^3H -polylysyl-tRNA to ribosomal sub-particles. The binding of ^3H -polylysyl-tRNA to ribosomal sub-particles was determined as indicated in "Methods."

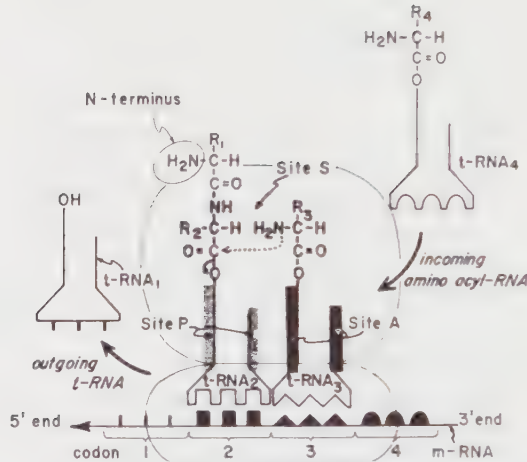
(aus: GOTTESMANN, S. 5566)

Lysyl-tRNA hemmt diese Bindung. Gebundene Polylysyl-tRNA reagiert im Gegensatz zu Lysyl-tRNA mit Puromycin ohne Zugabe von GTP und Überstandsfaktoren und bildet Polylysyl-Puromycin. Unter entsprechenden Bedingungen findet nur ein beschränkter Einbau von Lysin in gebundenes Polylysyl statt. Für diese Anlagerungsreaktion ist aber eine Polyadenylatsequenz der mRNA von mehr als drei Nukleotiden erforderlich.

Chlortetracyclin ist ein guter Hemmstoff der Anlagerung von Lysin an Polylys-tRNA, hat aber keinen Einfluß auf die Spaltung von Polylysyl-tRNA durch Puromycin. Da Tetracyclin die Anlagerung von Aminoacyl-tRNA an 30S Ribosomen hemmt, die Puromycinreaktion jedoch nicht beeinflusst, deutet dies darauf hin, daß Puromycin die A-Seite nicht so besetzt, daß es sich mit dem Ort der Tetracyclinwirkung in der A-Seite stört. (Siehe dazu später die Versuche von TANAKA (1972) und COUTSOGEOGPOULOS (1967)).

Die größere Reaktionsfähigkeit von Polylysyl-tRNA mit Puromycin im Vergleich zur Lysyl-tRNA könnte man der Abwesenheit einer geladenen α -Aminogruppe oder andererseits Anwesenheit einer Peptidbindung an der C-terminalen Aminosäure der Peptidyl-tRNA zuschreiben. Um diese Möglichkeiten zu testen, wurden neben Phenylalanyl-tRNA Phenylalanyllactyl-tRNA und N-acetylphenylalanyl-tRNA getestet. Obwohl alle drei Moleküle sich gleich gut an Ribosomen in Gegenwart von Poly-U binden, wird N-acetylphenylalanyl-tRNA dreimal leichter durch Puromycin abgespalten und als N-acetylphenylalanyl-Puromycin freigesetzt als im Vergleich dazu Phenylalanyl-tRNA. Phenylalanyllactyl-tRNA war nur halb so angreifbar wie Phenylalanyl-tRNA. Dies zeigt, daß die Peptidtransferase Aminoacyl-tRNA von Peptidyl-tRNA durch die Peptidbindung in letzterer unterscheidet.

COUTSOGEOGPOULOS (1967) untersuchte den Effekt von steigenden Konzentrationen von Phenylalanyl-tRNA auf die Hemmung der Poly-U abhängigen Synthese von Poly-phe durch verschiedene Antibiotika, unter anderem Puromycin. Die Hemmung war nicht rückgängig zu machen durch steigende Phenylalanyl-tRNA Konzentrationen, wie es bei rein kompetitiver Hemmung zu erwarten wäre. Er schlägt vor, daß Puromycin sich dem Ribosomenkomplex nicht über die A-Seite nähert, sondern über eine besondere S-Seite, an der das Aminoacyladenylende der gebundenen Aminoacyl-tRNA mit dem Peptidladenylende der Peptidyl-tRNA reagiert, um eine Peptidbindung einzugehen.



Schematic diagram of peptide-bond formation on the ribosome. Adapted from Schweet *et al.* (1964). Sites A, P, S, and tRNAs are not drawn to scale; site S is exaggerated for purposes of discussion.

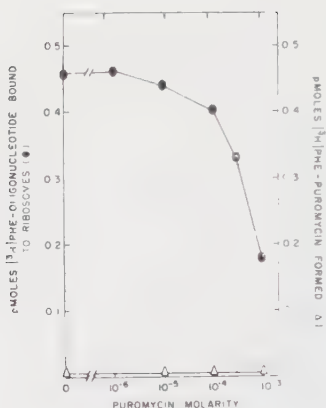
(aus: COUTSOGEOGPOULOS (1967), S. 46)

"Diese S-Seite könnte (1) allein eine ribosomale Stelle, (2) eine Stelle am Enzym (vielleicht Peptidyltransferase) oder (3) eine kombinierte Ribosomenenzymstelle sein. Obwohl die S-Seite als Fortsetzung von A und P angesehen werden kann, sind letztere definitionsgemäß primär verbunden mit den tRNA-Anteilen von Aminoacyl- und Peptidyl-tRNA, während die S-Seite als separate Stelle gedacht ist." Wenn man davon ausgeht, daß Puromycin sich irgendwann bei der Anlagerung ans Ribosom an der A-Seite bindet, müßte man erwarten, daß Aminoacyl-tRNA und Puromycin um die A-Seite konkurrieren, und daß durch höhere Konzentrationen von Aminoacyl-tRNA die Hemmung durch Puromycin aufgehoben oder geschwächt werden könnte. Dies ist jedoch experimentell nicht festzustellen. COUTSOGEOGPOULOS bietet dafür folgende Erklärung: "Durch die

Wirkung des Teils der tRNA, der nicht im Puromycin vorkommt, kann sich diese ankommende Aminoacyl-tRNA während der Knüpfung der Peptidbindung an den mRNA-Ribosomenkomplex an der A-Stelle binden, ohne die Bindung von Puromycin zu beeinflussen. Wenn wir annehmen, daß die strukturelle Ähnlichkeit von Puromycin zum Aminoacyladenyllylende von Aminoacyl-tRNA Grund für die Puromycinwirkung ist, sollten wir weiter annehmen, daß die Stelle der Puromycinanlagerung Teil dessen ist, was wir als Stelle S definiert haben. Während der Peptidelongation bindet sich die ankommende Aminoacyl-tRNA fest an die A-Stelle, wobei das Aminoacyladenyllylende der gebundenen Aminoacyl-tRNA die S-Stelle besetzt. Mit anderen Worten: das Substrat Aminoacyl-tRNA bindet sich an beide Stellen, A und S. Abhängig von der Konzentration von Puromycin verdrängt letzteres mehr oder weniger effektiv das Aminoacyladenyllylende der gebundenen Aminoacyl-tRNA und reagiert, als Substrat für die S-Stelle, weiterhin mit der Peptidyl-tRNA an der P-Stelle." (COUTSOGEOGPOULOS, S. 1709/1710)

Diese Erklärung wird auch unterstützt durch Ergebnisse von WETTSTEIN und NOLL (1965), die fanden, daß die ribosomalen Bindungsstellen in gleichem Ausmaße durch tRNA besetzt sind, gleichgültig, ob Puromycin an- oder abwesend ist. Ihrer Meinung nach konkurriert Puromycin mit der ankommenden Aminoacyl-tRNA nicht durch blockierende Anlagerung an die tRNA-Bindestelle des Ribosoms, sondern vielmehr durch Besetzung der Enzymstelle, die bei der Bildung der Peptidbindung eine Rolle spielt.

Später zeigte PESTKA (1969), daß Puromycin die Anlagerung von Phenylalanyloligonukleotiden an Ribosomen hemmen kann.



—Binding of Phe-oligonucleotide to ribosomes and Phe-puromycin formation as a function of puromycin concentration. Reactions contained the components indicated in the legend to Fig. 4; puromycin concentration is indicated on the abscissa.

—●—, Phe-oligonucleotide binding to ribosomes, assayed as described in *Experimental Procedure*.

—△—, Phenylalanyl - puromycin formation was determined by extracting Phe-puromycin formed into ethyl acetate after making reaction mixtures alkaline with ammonium hydroxide¹¹

(aus: PESTKA (1969) S.48)

Dies steht nur dann im Widerspruch zu den Ergebnissen von SPYRIDES (1964) (keine Hemmung der Bindung von Aminoacyl-tRNA an Ribosomen) wenn man keinen Unterschied macht zwischen A-Stelle und Puromycinanlagerungsort. Unterscheidet man aber A-Stelle als Anlagerungsort des tRNA-Teils einer Aminoacyl-tRNA und S-Stelle als Anlagerungsort des CCY-Endes, somit auch der Phenylalanyloligonukleotide und Puromycins, fällt der Widerspruch fort.

Die in den erwähnten Versuchen von TAKANAMI (1964) eingesetzten tRNA-Bruchstücke verwendeten MONRO und MARCKER (1967) (s.a. MONRO, 1967). Sie schufen die "fragment reaction": Ein endständiges Oligonukleotid einer tRNA mit angehängter Aminosäure kann in Gegenwart von Alkoholen (besonders Methanol) bei 0°C so an eine 50S Ribosomenuntereinheit gebunden werden, daß die Transferase die Möglichkeit hat, ein Peptid einer Peptidyl-tRNA auf die

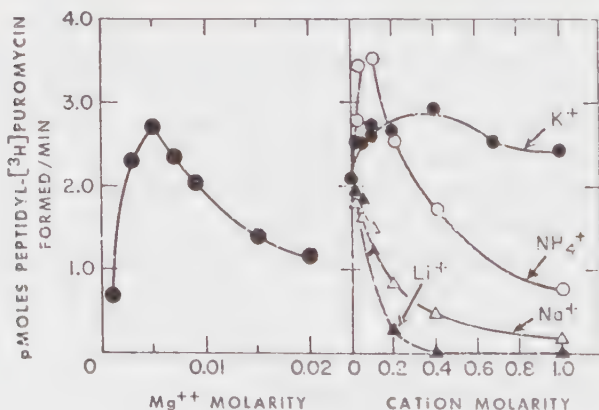
Aminosäure des Aminoacyl-tRNA-Fragments zu übertragen. Sie testeten eine Reihe von Kombinationen von tRNA-Fragmenten mit diversen Aminoacyl- und Peptidyl-tRNAs. Unter anderem reagierte dabei auch Puromycin mit einem CCA-fMet (MONRO und VAZQUEZ, 1967) und mit fMet-tRNA ohne 30S, mRNA und Faktoren. Dies spricht auch für die weitgehend einer Aminoacyl-tRNA analoge Behandlung von Puromycin im Laufe der Proteinbiosynthese. Die Formylgruppe war übrigens keine Voraussetzung für eine Reaktion; die Einbaurate war jedoch höher als bei der unformylierten Aminosäure, eventuell dadurch, daß fMet stabiler ist.

In Fortsetzung dieses Programms untersuchten MADEN et al. (1968a) die Rolle der 50S Untereinheit. Ihre Ergebnisse zeigen (s.auch ZAMIR et al., 1966), daß die Puromycinreaktion auch ohne Überstand und GTP ablaufen kann. Grundsätzlich zeigt die Reaktion mit 50S und 70S gleiche Eigenschaften, es wird z.B. an beiden Komplexen die Puromycinreaktion durch Chloramphenicol gehemmt. Daß die Reaktion zwischen Polyphenylalanyl-tRNA und Puromycin an 50S abläuft, und daß Überstandsfaktoren nicht nötig sind, ist ein Hinweis darauf, daß die Puromycinreaktion durch die 50S Ribosomenuntereinheit selbst katalysiert wird. Nur im Zusammenhang mit anderen Arbeiten (BRETSCHER und MARCKER, 1966, und ZAMIR et al., 1966) mit in Salzlösung gewaschenen Ribosomen kann aber ausgeschlossen werden, daß ein Bestandteil der Überstandsenzyme, der fest und spezifisch an den 50S Peptidyl-tRNA-Komplex gebunden wird, Peptidyltransferaseeigenschaften hat.

Für den Peptidyltransfer auf Puromycin sind nach MADEN und MONRO (1968b) divalente und monovalente Kationen nötig. Das Optimum der Magnesiumionenkonzentration liegt bei 3-100 mmolar; Mg^{2+} kann durch Calcium oder Mangan ersetzt werden. Andere divalente Ionen sind wirkungslos oder wir-

ken hemmend. Das Optimum der wichtigen monovalenten Ionen liegt für Ammonium und Kalium zwischen 10 mmolar und 1 molar. Untersucht wurde die Puromycinreaktion mit Polyphenylalanyl-tRNA und Formylmethionyloligonukleotiden als Donor. Im fMet-Oligonukleotidsystem sind die Grenzen des Wirkungsoptimums der Ionenkonzentration enger. MADEN et al. vermuten hier eine weniger enge Bindung von fMet ans Ribosom, die empfindlich auf Schwankungen der Ionenkonzentration reagiert. Magnesium scheint ein spezifischer Kofaktor der Peptidyltransferase zu sein und außerdem die Aufgabe zu haben, negativ geladene Phosphatreste der rRNA zu neutralisieren.

Den gleichen Einfluß der Ionenkonzentration zeigte auch PESTKA (1971) in einer Reihe von Vorversuchen zur Testung der inhibitorischen Wirkung diverser Antibiotika auf die Puromycinreaktion.



Reaktionsfähigkeit von Puromycin in Abhängigkeit von der Konzentration verschiedener Ionen
(nach: PESTKA (1971))

Eine Arbeit von TANAKA et al. (1972) stellt die vorher gefundenen Tatsachen in gewisser Weise in Frage und erweitert sie

Danach greift Puromycin die tRNA in der P-Seite zwar von der A-Seite her an, muß jedoch selbst nicht unbedingt in der A-Seite sitzen. Auf jeden Fall reagiert Puromycin mit der Peptidyltransferase so, wie es die Aminoacyl-tRNA in der A-Seite tut.

Die Wirkung von Puromycin auf Polyribosomen

Schon früh erkannte man, daß die Wirkung von Puromycin reversibel ist. TAKEDA¹ zeigte 1960, daß *Pseudomonas fluorescens* bald nach Herauswaschen des Antibiotikums die Enzyme synthetisiert, die Mandelsäure oxidieren. Das weist darauf hin, daß die Ribosomen die Behandlung mit Puromycin im wesentlichen unverändert überstanden haben.

Zu den Folgen der Puromycineinwirkung gehört die Veränderung des Ribosomenprofils der Zelle: die Zahl der großen Polysomen geht zurück, die der kleinen und Monosomen nimmt zu. Dieser Abbau der Polysomen entsteht durch das Abwandern von Ribosomen von der mRNA; er wird als "break down" bezeichnet und kommt normalerweise vor, wenn an einem Ribosom ein Protein gebildet wurde, und am Terminatorcodon die Proteinsynthese beendet ist. Dadurch, daß sich gleichzeitig neue Ribosomen am Initiationscodon an die mRNA binden, behalten die Polysomen ihre ungefähre Größe. Die Größe der Polysomen beruht also auf einem Gleichgewicht zwischen Initiation und Termination und dürfte vor allem durch die Länge der mRNA bestimmt werden.

HARDESTY et al. (1963) fanden, daß der break-down in Retikulocyten abhängig ist von der Hämoglobinsynthese. Jedes Ribosom wird vom Polysom frei, wenn die Globinkette fertig ist und freigesetzt wird. HARDESTY et al. haben nach Inkubation von intakten Retikulocyten die Größenverteilung der Polysomen gemessen. Dabei fanden sie nach Zugabe von Puromycin einen Abfall der Polysomen und eine Zunahme von 80S Monosomen. BURKA und MARKS bestätigten dies 1964 und zeigten weiter, daß die Proteinbiosynthese auch durch Aminosäurehunger der Zellen gehemmt werden kann, wobei es jedoch nicht zur Freisetzung von Peptidketten kommt und auch zu keinem break-down der Polysomen.

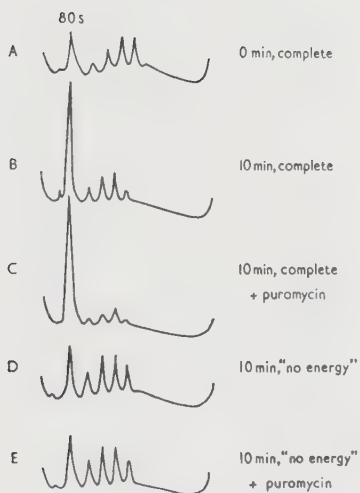
¹et al.

COLOMBO et al. (1965) untersuchten, ob die Dauer der Gabe von Puromycin einen Einfluß auf die Freisetzung der Ketten und den break-down hat. Sie fanden, daß bei kurzfristiger Gabe nur teilweise Freisetzung der Ketten erreicht wurde und nur wenig break-down stattfand, bei langfristiger Gabe jedoch alle Ketten freigesetzt wurden und Polysomen-break-down in höherem Maße vorkam. Außerdem verwendeten sie das Antibiotikum Cycloheximid, das bei 80S Ribosomen die Proteinbiosynthese durch Behinderung der Translokation hemmt. Unter Zusatz von Cycloheximid (oder ohne Energiezufuhr) kann Puromycin zwar Peptidketten noch von Ribosomen freisetzen, jedoch keinen oder nur wenig Polysomen-break-down verursachen.

In Rattenleberzellen konnten VILLA-TREVINO et al. (1964) nach Gabe von Puromycin einen deutlichen break-down mit Zunahme der Monosomen und auch von Tri- und Tetrameren zeigen. Die Proteinsynthese war nach 5 min. zu 99% gehemmt, wenn Puromycin und Aminosäuren gleichzeitig intraportal injiziert wurden. Die kleinen Polysomen waren proteinbiosynthetisch aktiv und es gibt keine Hinweise darauf, daß sie eine besondere Gruppe von Aggregaten darstellen, die durch besondere Umstände, z.B. eine stabilere mRNA, entstanden wäre. Es scheint so zu sein, daß die Änderung der Polysomenverteilung durch Puromycin die Einstellung auf ein neues Gleichgewicht darstellt, das während der allmählichen Ausscheidung von Puromycin langsam zur Ausgangslage zurückkehrt. Es wird ausführlich diskutiert, welche Mechanismen diese Gleichgewichtsänderung hervorrufen könnten. Einerseits kann ein vermehrter Abbau von mRNA zu einer numerischen Abnahme der einzelnen Polysomengrößen führen (z.B. weniger Polysomen mit 10 Ribosomen), andererseits führt eine Beschleunigung der Ribosomenwanderung an der mRNA bei gleichbleibender Anlagerungsrate zu einem größeren Abstand zwischen den Ribosomen. Daher wird eine mRNA nur von wenigen Ribosomen besetzt sein, es kommt zur Bil-

dung von kleinen Polysomen. Die Ursache für diese Beschleunigung könnte im Folgenden liegen: Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Proteinsynthese ist das Zusammenfinden und die Bindung von Triplet und dazu spezifisch passender tRNA und deren Bindung an das Ribosom. Durch Puromycin, das sich rasch, ohne Rücksicht auf die Basensequenz der mRNA an die A-Seite anlagern kann, wird dieser Schritt übergangen. Wiederholt sich bei höherer Konzentration von Puromycin dieses ersatzweise Anlagern sehr oft, ergibt sich daraus im Endeffekt eine deutliche Beschleunigung.

Sehr ausführlich befaßten sich WILLIAMSON und SCHWEET (1965) mit der Wirkung von Puromycin auf Polysomen. Das Hauptproblem ist dabei die Frage, ob der break-down eine Folge der Kettenfreisetzung durch Instabilität des mRNA-Ribosomen-Komplexes ist, oder ob Puromycin direkt eine Wirkung auf das Polysom hat. Im zellfreien Kaninchenretikulocyten-system kann nach dem Verlust einer Peptidkette ein Ribosom sofort an einem internen Codon eine neue Kette initiieren, die am Ende der mRNA freigesetzt wird. Normalerweise findet die Initiation nur am Initiationscodon statt, da sich hier 80S Ribosomen anheften können; besteht aber erst einmal ein 80S-Ribosomen-mRNA-Komplex, so ist eine Reinitiation nach dem Verlust der Peptidkette möglich. - Die Puromycinwirkung auf die Polysomen besteht nicht in einer Freisetzung der Peptidketten, denn diese findet auch ohne break-down statt (Hemmung mit Cycloheximid). Zur Freisetzung von Peptidketten durch Puromycin ist nur wenig Proteinbiosynthese und nur wenige Peptidbindungen nötig, zum break-down aber eine hohe Syntheseaktivität. Dabei werden unvollständige Peptidketten frei und andererseits neue Ketten intern initiiert, wodurch Peptide entstehen, denen am N-terminalen Ende Aminosäuren fehlen. Das Vorhandensein von wachsenden Peptidketten ist nicht nötig für die Stabilität des Polysoms.

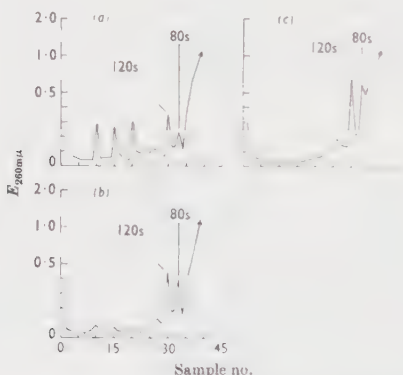


Sedimentation patterns of ribosomes - conditions for puromycin breakdown of polyribosomes in the cell-free system. 1-X ribosomes incubated in the cell-free system for the indicated time: curve A and B, complete system; curve C, with 1.4×10^{-4} M-Puromycin; curve D, minus energy, enzyme and glutathione; curve E, as D but with 1.4×10^{-4} M-puromycin.

(aus: WILLIAMSON und SCHWEET, S.386)

Nach WILLIAMSON und SCHWEET wirkt Puromycin als kompetitives Substrat für die AAtRNA, kann diese besonders bei einer Verlangsamung der Wanderung durch Warten auf seltene tRNAs verdrängen bzw. ersetzen und beschleunigt so die Wanderungsgeschwindigkeit. Zu entsprechenden Ergebnissen kam auch NOLL et al. (1963) in zellfreiem System aus Rattenleber.

FRANKLIN und GODFREY (1966) untersuchten die Puromycinwirkung auf Polysomen in HeLa-S₃-Zellen und fanden auch dort nach Inkubation ein fast vollständiges Verschwinden der schweren Polysomen, während die Anzahl der leichten Polysomen mit weniger als 4 Monomeren sich deutlich erhöhte.



Sucrose-density-gradient profiles of extracts from dispersed liver cells from SPF albino male rats. (a) Control preparation; (b) and (c) cells incubated with 10 μ g. and 50 μ g. of puromycin/ml. respectively for 30 min. at 37° before disruption and density-gradient analysis.

(aus: FRANKLIN und GODFREY, S.518)

Die Anzahl der 60S und 40S Untereinheiten ändert sich durch Puromycin nicht. Eine Dissoziation von Monosomen oder umgekehrt eine Reassoziaton aus den Untereinheiten beeinflusst Puromycin auch nicht.

Ebenfalls HeLa-S₃-Zellen untersuchten JOKLIK und BECKER (1965), wobei auch sie eine Abnahme der großen und eine Zunahme der kleineren leichten Polysomen und 74S Monosomen fanden. Die durch Puromycin greigesetzten Ribosomen können leichter wieder in Polysomen reinkorporiert werden als andere Monosomen. Dies kommt vermutlich dadurch zustande, daß die von der mRNA abgelaufenen Monosomen in der Nähe der mRNA bleiben, nicht weiter ins Cytoplasma abwandern und schneller wieder zum Einbau in Polysomen

zur Verfügung stehen.

HORI et al. (1967) untersuchten die Globinsynthese in einem tryptophanfreien, sonst aber vollständigen Medium. Tryptophan kommt in der Globinkette nur N-terminal-nahe in Position 14 der α -Kette und 15 und 17 der β -Kette vor. Beim Fehlen der essentiellen Aminosäure Tryptophan kommt es zu einer Hemmung der Globinsynthese und infolgedessen zu einer Disaggregation der Polyribosomen. Gibt man Tryptophan später hinzu, so bilden sich die Veränderungen zurück und eine normale Ribosomenverteilung bzw. Polyribosomenverteilung tritt wieder auf. Aufbauend auf diesen Versuch testeten FREEDMAN et al. (1968) die Wirkung von Puromycin auf das Globinsynthesystem im tryptophanfreien Medium. Auch hierbei kommt es wieder zum Abstoppen der Proteinbiosynthese, sobald diese an der Position des fehlenden Tryptophans angelangt ist. Hier kann sich nun Puromycin anstelle des Tryptophans ans Ribosom anheften und statt Tryptophan eingebaut werden. Dadurch kommt es zu einer Regeneration der normalen Polysomenverteilung, da durch Puromycin die vorher gebildete Kette abgespalten und intern eine neue Kette initiiert wird. Auch wenn schon eine Disaggregation stattgefunden hat, wird nach späterer Zugabe von Puromycin das normale Polysomenverteilungsmuster wiederhergestellt. Hier ersetzt also das Puromycin das Tryptophan und ermöglicht die weitere Ribosomenbewegung. In diesem Versuch wird Puromycin in einer sehr geringen Konzentration von 2.5×10^{-5} M benützt, die selbst noch keinen breakdown verursacht, sondern hier einen eher gegensinnigen Effekt hat.



Fig. 1

Puromycin verhindert (Spalte 2) oder regeneriert (Spalte 3) die Disaggregation von Polysomen aufgrund von Tryptophanmangel in Kaninchenretikuloeyten.

Absorption bei 2600 nm (=Polysomenmuster)

Einbaerate von ^{14}C -Leucin

(aus: FREEDMAN et al., S.316)

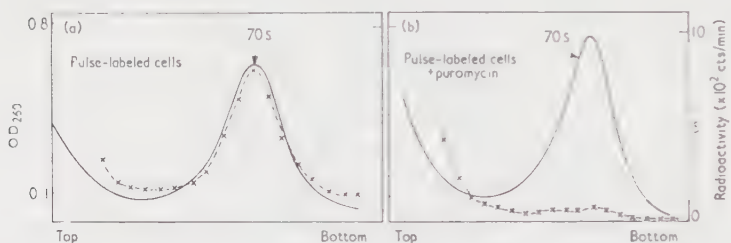
Auch BISHOP (1968) fand einen break-down von Polysomen in Retikulozyten mit einer Zunahme der Monosomen, jedoch nicht der Untereinheiten. Der Einbau von Phenylalanin mit entweder ribosomalen Monomeren oder Untereinheiten war verringert. Die Ergebnisse unterstützen nicht die These, daß die Untereinheiten die obligaten Initiatoren der Polypeptidsynthese sind. Wenn man die Polysomen und die Monosomen in den mit Puromycin behandelten Zellen mißt, nehmen die Polysomen um 24% ab, und die Monosomen um 44% zu. Der Anteil der Untereinheiten ist unverändert. Wenn Puromycin abgesetzt wird und die Zellen reinkubiert werden, bilden sich schnell Polysomen und der Anteil der freien Monosomen nimmt ab. Es besteht die Möglichkeit, daß ein begrenzter Pool von Untereinheiten erhalten bleibt, und daß die Monosomen schnell durch diesen Pool gehen, wenn die Proteinsynthese fortgesetzt wird.

In Stämmen von E.coli mit strenger Kopplung von RNA- und Proteinsynthese (=rel⁺=stringent) führt Mangel an Aminosäuren zur Hemmung der Proteinsynthese und zu einem Zerfall der Polysomen zu Monosomen. In relaxed Stämmen (rel⁻) ohne diese strenge Kopplung bleiben die Polysomen erhalten.

RON et al. (1966) setzten je einem Stamm Puromycin zu und fanden einen Zerfall von Polysomen zu Monosomen, der in stringent und relaxed Stämmen gleich war. - Die relaxed-Stamm-Ribosomen scheinen so verändert zu sein, daß sie mit Peptidyl-tRNA und mRNA stabile Komplexe ohne Aminoacyl-tRNA bilden. Wird aber durch Puromycin auch das Peptid als Peptidylpuromycin frei und die tRNA aus der P-Seite befreit, so reicht auch die vermehrte Stabilität der relaxed-Stamm-Ribosomen nicht aus, einen Zerfall zu Monosomen zu verhindern.

Nach KOHLER et al. (1968) findet man nach schonendem Aufschluß in E.coli freie 70S Ribosomen neben Polysomen und

Untereinheiten. In Puromycin-behandelten Zellen kommen jedoch nur 70S Ribosomen vor; auch *in vitro* findet keine Dissoziation zu Untereinheiten durch Puromycin statt, auch wenn es die wachsende Peptidkette entfernt hat.



Effect of PM on ribosomes with ¹⁴C-labeled polypeptide formed *in vivo*.

An exponentially growing culture was incubated for 20 sec with [¹⁴C]leucine (0.005 μ C and 0.03 μ g/ml.) and was immediately poured on ice. An extract was prepared in Tris-Mg²⁺ buffer with the addition of 0.2 μ g (Worthington) RNase/ml. After addition of KCl (60 mM) and GTP (2×10^{-5} M), to promote PM action, portions were incubated without PM (a), or with 250 μ g/ml. PM (b) for 10 min at 37°C and then were chilled. Analyses for distribution of ribosomes and of ¹⁴C as described in Materials and Methods. ---, Radioactivity; —, optical density.

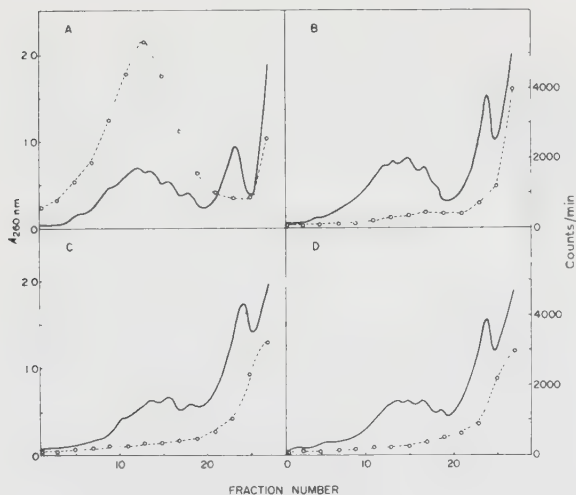
(aus: KOHLER et al., S.59)

Sie ziehen daraus die Schlußfolgerung, daß die "run off" Ribosomen als 70S Ribosomen vorliegen, und daß die Dissoziation extra gesteuert wird über einen nur in geringer Menge vorhandenen Dissoziationsfaktor. Daher gebe es nur wenig freie Untereinheiten.

Nach Beobachtungen von FLESSEL (1968) führt der break-down in M.lysodeiktikus zu 70S Ribosomen. Die Puromycinwirkung kann hier durch Chloramphenicol gehemmt werden: es findet keine Freisetzung von Peptidketten und keine Disaggregation statt.

JACOBS-LORENA et al. (1970) untersuchten die Neuinitiation von Ketten an internen Codons nach Verlust der Peptidkette infolge der Puromycinwirkung. Die Ribosomen verlassen das Polysom nicht unmittelbar nach Freisetzen der Peptidkette, denn eine kurze Einwirkung von Puromycin ändert das Poly-

somenverhältnis nicht; erst eine längere Einwirkung führt zur Disaggregation. Das weist darauf hin, daß die Ribosomen, nach Freisetzen der Peptidkette, an der mRNA entlangwandern. Eine Initiation nach Kettenverlust muß möglich sein, da eine Hemmung der Proteinbiosynthese mit Cycloheximid oder Sparsomycin (die die Bewegung an der mRNA stoppt) die Disaggregation verhindert.

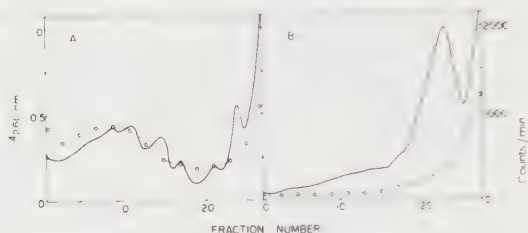


Polyribosome pattern after incubation with puromycin and cycloheximide. For each gradient 0.2 ml of reticulocytes were incubated for 1 min at 37° in 0.5 ml of standard medium containing 2 μ C of [14 C]amino acids (New England Nuclear, Inc.). A. Control. B. 0.1 m*M* puromycin added for 1 min. C and D. 0.1 m*M* cycloheximide added 1 min after puromycin and incubated 5 and 15 min, respectively. —, absorbance at 260 nm; ○—○, counts/min per fraction.

(aus: JACOBS-LORENA et al., S.176)

Die intern initiierten Protein konnten markiert und isoliert werden: sie erweisen sich als relativ instabil und angreifbar für proteolytische Enzyme. Unvollständige Ketten aus der vorzeitigen Freisetzung durch Puromycin dagegen sind normal stabil. Dies spricht für eine Faltung der Peptidkette in Sekundär- und Tertiärstruktur unmittelbar am Ribosom und sofort nach der Synthese. - Verwendet man neben Puromycin und Cycloheximid den spezifischen Initiationshemmstoff NaF, so wird die Peptidkette abge-

spalten, jede Ribosomenbewegung verhindert und eine Neuinitiation gestoppt.



Polyribosome pattern after incubation with puromycin and NaF. Reticulocytes were incubated as described under the legend of Fig. 1. A: Control. B: Reticulocytes incubated 1 min with 0.1 mM puromycin, 1 min with 0.1 mM cycloheximide and 1 min with 1 mM NaF. A sample analyzed at this time (not shown) showed an absorbance profile of polyribosomes similar to that of the control. The reticulocytes were washed and reincubated 5 min with standard medium containing 10 mM NaF as described in the text. —, absorbance at 260 nm. —○—, counts/min per fraction.

(aus: JACOBS-LORENA et al., S.177)

Eine Reinkubation nur mit Natriumfluorid führt zu sogenannten "run off"-Ribosomen, d.h. die Ribosomen wandern von der mRNA und führen zu einer Anhäufung von Monosomen.

Untersucht man die tryptischen Bestandteile der intern initiierten Ketten und vergleicht sie mit den Spaltprodukten normaler Proteine, so ergibt sich eine nur ungenügende Übereinstimmung. Dies ist möglich, wenn die interne Initiierung nicht "in Phase" erfolgt, d.h. das Ribosom erkennt nicht das eigentlich vorgesehene Triplet, sondern vertut sich in einem oder zwei Nukleotiden und erkennt als ein Triplet das letzte Nukleotid des einen und die beiden ersten Nukleotide des ursprünglich nächsten Triplets. Dadurch entstehen völlig neue Aminosäuresequenzen, die auch andere tryptische Peptide liefern. Jedoch auch bei Reinitiation "in Phase" kommen neue tryptische Peptide vor, und zwar diejenigen, die zwischen dem Punkt der Neuinitiation und dem nächsten Lysin (an dem Trypsin spaltet) gebildet werden. - Ein Stop am normalen Terminationscodon findet eventuell auch bei außerphasischer Initiation statt (Anlagerung von "Hemmschuhfaktoren" an mRNA).

Da Puromycin für jede Aminosäure einspringen kann, kommt es zu einer Beschleunigung der Ribosomenwanderung, da nicht lange auf die richtige Aminosäure gewartet werden muß. Da Puromycin jedoch nicht wie eine Initiationsamino-säure die P-Seite erreichen kann, sondern nur die Termination beschleunigt, kommt es zu einem Ungleichgewicht von Initiations- und Terminationsrate, woraus eine Disaggregation der Ribosomen resultiert.

Die Auflösung der Polysomen ist auch an histologischen Schnitten von Mäuselebern zu sehen. REID et al. (1970) zeigten, daß 20-30 min. nach einmaliger Injektion von 0.25 mg Puromycin eine Fragmentation und Degranulation des rauen endoplasmatischen Retikulums auftritt und eine Anhäufung von Mikrosomen und eine Verringerung der Zahl von Golgi-Vakuolen beobachtet wird.

Eine Methode zur Gewinnung von aktiven Ribosomenuntereinheiten aus Polysomen mit Hilfe von Puromycin beschrieben BLOBEL und SABATINI (1971). Sie sei hier erwähnt, da sie teilweise in Widerspruch steht zu den Ergebnissen, die hier geschildert wurden. Werden Leberpolysomen bei 0°C und hoher Ionenkonzentration (1 M KCl) mit Puromycin behandelt, kommt es zur vollständigen Freisetzung der Peptidketten ohne Dissoziation von Ribosomen. Wird der Ansatz anschließend auf 37°C erwärmt, zerfallen die Ribosomen vollständig zu Untereinheiten. Ohne Puromycin führt eine entsprechende Behandlung nur zu einer teilweisen Dissoziation der Ribosomen. Die mit dieser Methode gewonnenen Untereinheiten sind biologisch aktiv im Gegensatz zu den aufgrund der sonst angewandten Methode (EDTA-Dissoziation).

Puromycin als Werkzeug

Im folgenden sollen einige Arbeiten referiert werden, bei denen Puromycin eingesetzt wurde, um verschiedene Probleme der Biochemie zu beantworten. Anhand dieser Beispiele soll versucht werden, die Bedeutung des Antibiotikums Puromycin für die Grundlagenforschung zu veranschaulichen. Es ist dabei bisweilen nötig, nochmals kurz auf schon geschilderte Versuche einzugehen, da Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von Puromycin oft auch neue Aspekte der Proteinbiosynthese brachten.

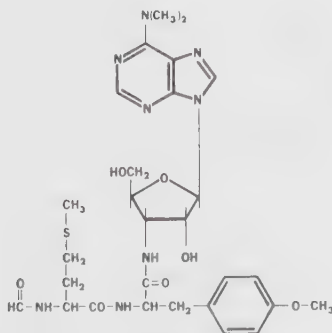
Puromycin und die Erforschung der Proteinbiosynthese

1. Versuche zur Initiation

BRETSCHER und MARCKER (1966) berichteten über die Unterschiede im Verhalten der Formalmethionyl-tRNA und der Methionyl-tRNA. Demnach besetzt die Methionyl-tRNA_M die A-Seite, die Formylmethionyl-tRNA_F die P-Seite des Ribosoms. Die Formylmethionyl-tRNA kann auch in unformylierter Form als Initiator-tRNA wirken. Eine Reaktion mit Puromycin findet nur statt, wenn sich die fMet-tRNA mit GTP, RNA und Initiationsfaktoren an die 30S Untereinheit gebunden hat. Wird GTP durch GMP-PcP ersetzt, findet keine Puromycinreaktion statt; für die Reaktion wird demnach Energie benötigt. Auch hier läßt sich nachweisen, daß die fMet-tRNA an das Ribosom gebunden ist, jedoch anscheinend nicht in der P-Seite (s. OHTA¹, 1967; MUKUNDAN¹, 1968). Da Tetracyclin, das die Anlagerung von Aminoacyl-tRNA an die A-Seite verhindert, auch die Anlagerung von fMet-tRNA hemmt, kann man schließen, daß die fMet-tRNA die P-Seite über die A-Seite erreicht.

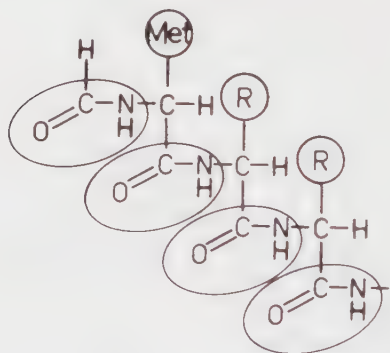
Eine Reaktion mit Puromycin erfolgt in Anwesenheit von AUG mit fMet-tRNA_F, Met-tRNA_F und Acetyl-Met-tRNA_F. Die fMet-tRNA_F reagiert jedoch 5-10 mal schneller als die beiden anderen tRNAs mit Puromycin.

¹ et al.



N-Formyl-Methionyl-Puromycin

Diese besondere Bedeutung der formylierten Form der Met-tRNA_F hat meiner Ansicht nach ihre Ursache in der Anwesenheit einer Peptidbindung im Molekül. Wie GOTTESMANN (1967) schildert, erkennt die Peptidyltransferase eine Peptidyl-tRNA an der Peptidbindung im Molekül. Ebenso kann man die N-formyl-Gruppe in der fMet-tRNA als "Peptidbindung" auffassen, und damit versuchen zu erklären, warum die fMet-tRNA_F offensichtlich leichteren Zugang zur P-Seite findet. Die folgende Abbildung zeigt, daß die Formylgruppe des endständigen Methionins durchaus die sinngemäße Fortsetzung, bzw. der Anfang einer Reihe von Peptidbindungen darstellen kann.



F-Methionylpeptid

Nach Ergebnissen von ZAMIR et al. (1966) findet die Puro-mycinreaktion mit Formylmethionyl-tRNA auch ohne die Anwesenheit von Überstandsfaktoren statt. Auch das spricht für die direkte Anlagerung von fMet-tRNA an die P-Seite. Für eine Reaktion mit Met-tRNA sind Überstand und GTP nötig.

SARKAR und THACH (1968) berichten, daß es nur eine Eintrittsseite A am Ribosom zur Dekodierung aller tRNAs gibt; diese ist größtenteils auf der 30S Untereinheit gelegen, zum Teil aber auch - für das CCA-Ende - an der 50S Unter-

einheit. Mit Tetracyclin kann man die Anlagerung von fMet-tRNA an die 30S Untereinheit hemmen. Nach der Assoziation mit 50S findet aber unter GTP-Hydrolyse eine Translokation statt. Diese kann man durch die Möglichkeit zur Puromycinreaktion zeigen, die nur gegeben ist, wenn die Donor-tRNA in der P-Seite gebunden ist.

Auch MUKUNDAN et al. (1968) konnten zeigen, daß die Anlagerung von tRNA an die 30S Untereinheit geschieht, daß sich die Reaktion des Peptidrestes mit Puromycin aber an der 50S Untereinheit abspielt.

Die fMet-tRNA_F bindet sich, wie RUDLAND et al. (1969) zeigen konnten, als einzige tRNA mit AUG, GTP und Initiationsfaktoren an 70S. Dies ist dadurch möglich, daß die Initiationsfaktoren und GTP ganz spezifisch die Bindung von fMet-tRNA stimulieren. Die genannten Komponenten sind auch für die Anlagerung an die 30S Untereinheit nötig.

CASKEY et al. (1968) prüften 1968 die Universalität des genetischen Codes: Dabei untersuchten sie das Reaktionsvermögen von tRNAs aus Meerschweinchenleber in einem zellfreien System aus E. coli. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch das Reaktionsvermögen von Puromycin mit zwei Typen von Methionyl-tRNA aus Leber getestet. Dabei stellte sich heraus, daß der Typ I wesentlich besser mit Puromycin reagiert als der Typ II. CASKEY et al. führen dies auf die entwicklungsgeschichtliche Verwandtschaft mit der jeweiligen Methionyl-tRNA in Bakterien zurück: Der Typ I würde der fMet-tRNA_F entsprechen, die, wie gezeigt, leichter mit Puromycin reagiert, der Typ II der Met-tRNA_M. Es kann sein, daß diese Unterschiede der Leber-Met-tRNAs auf der Abstammung von den Methionyl-tRNAs in Bakterien beruhen, ohne daß dem heute noch eine Bedeutung für die Proteinsynthese in der Leber zukommt.

Auch in der "fragment-reaction" wurde Puromycin mit termi-

nalen Fragmenten von fMet-tRNA eingesetzt. Dabei verhalten sich nach MONRO und MARCKER (1967) die Fragmente wie komplette tRNAs. Auch das Enzym, das die Peptidbindung knüpft, ist das gleiche wie bei einer Reaktion mit kompletter tRNA.

MISKIN et al. (1968) konnten bei der "fragment-reaction" mit fMet-tRNA-Oligonukleotiden und Puromycin bei 0°C zwei Grade der Aktivität der Peptidyltransferase feststellen, die je nach der Art der Präparation der Ribosomen auftrat. Die "aktive" Form der Transferase ist abhängig von NH_4^+ und K^+ (s. MADEN, 1968b). Ohne diese Ionen ist die Transferase "inaktiv", läßt sich aber durch Zugabe von NH_4^+ und K^+ reaktivieren, wenn man gleichzeitig auf 37°C erhitzt. Es ist noch nicht klar, worin der Unterschied zwischen den beiden Formen besteht; der Sedimentationskoeffizient der größeren Ribosomenuntereinheit bleibt mit 50S jedenfalls konstant, es kommt nicht zur Ablösung einzelner Protein- oder rRNA-Stücke.

LIVINGSTON und LEDER setzten 1969 fMet-Puromycin als Substrat für die Deformylase ein und fanden, daß fMet-Puromycin deformyliert werden kann, ebenso wie es fMet-Peptide können. Die Deformylase kann jedoch nicht mit fMet-tRNA und fMet reagieren. Man sieht daraus, daß die Deformylierung nur nach dem Transfer von Methionyl auf die tRNA und nach einer anschließenden Peptidbindung stattfinden kann.

GIEGE et al. konnten 1972 zeigen, daß Aminoacyl-tRNA-Synthetasen verschiedene tRNAs falsch beladen können. Insbesondere gelang es tRNA_{fMet} aus E. coli durch Phenylalanyl- und Valyl-tRNA-Synthetasen mit Phenylalanin und Valin zu beladen. Diese Phenylalanyl-tRNA_{fMet} und Valyl-tRNA_{fMet} konnten von der Met-tRNA-Formyltransferase formyliert werden. 1973 konnten GIEGE et al. zeigen, daß diese tRNAs ebenso Initiationskomplexe bilden können, in Gegenwart von Poly AUG, Poly UG und Coliphagen R17 RNA, wie es die fMet-tRNA tut. Zur Testung der Funktionsfähig-

keit der so entstandenen 70S Initiationskomplexe wurde Puromycin eingesetzt. Es zeigte sich, daß die formylierte fehlbeladene tRNA_{fMet} mit Puromycin genauso wie die fMet-tRNA reagiert. Diese Reaktion war ebenso GTP- und Initiationsfaktor-abhängig. Die unformylierten fehlbeladenen tRNAs reagierten nicht mit Puromycin. Daraus ist deutlich zu sehen, daß für die Bildung eines funktionsfähigen Initiationskomplexes die Struktur der tRNA die entscheidende Rolle bei der Initiation spielt. Welche Aminosäure an die Initiator-tRNA gebunden ist, scheint keine Bedeutung zu haben; die Formylierung der Aminosäure ist jedoch in jedem Fall notwendig.

RUDLAND und KLEMPERER (1971) konnten einen Faktor isolieren, der speziell die tRNA_{fMet} nach dem Transfer des fMethionylrestes aus der P-Seite unter GTP-Verbrauch befreit. Die Wirkung dieses Faktors ist nicht durch Fusidinsäure hemmbar, die die Freisetzung der übrigen tRNAs durch Verhinderung der Hydrolyse von ATP hemmt. Im Versuch wurde ein Initiationskomplex aus 70S, fMet-tRNA, mRNA, Faktoren und GTP gebildet. Durch Transfer auf Puromycin wurde die tRNA entladen, und an diesem Komplex die Wirkung des Faktors getestet. - Über einen ähnlichen Faktor, der die Donor-tRNA aus der P-Seite bei der Elongation befreit, berichteten ISHITSUKA und KAJI (1970).

2. Versuche zur Elongation

MORRIS und SCHWEET (1961) fanden, daß Puromycin Proteine von Ribosomen ablösen kann. Diese Polypeptide, die zuvor an die Ribosomen gebunden waren, ließen sich als Vorstufen der Hämoglobinketten identifizieren, die in dem hier verwendeten Retikulozytensystem gebildet werden. Die Ribosomen erweisen sich dadurch als der Ort, an dem die Proteinbiosynthese stattfindet.

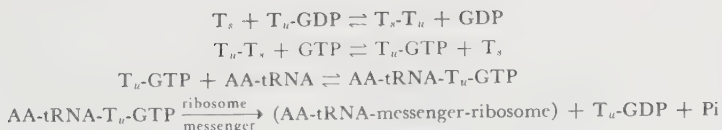
Nach TRAUT und MONRO (1964) kann das Ribosom zwei "Zustände" einnehmen: Der eine erfordert zur Reaktion mit Puromycin die Anwesenheit von Überstandsfaktoren und einem GTP-regenerierenden System, im anderen Zustand sind diese Zusätze nicht erforderlich. Die "Zustände" wurden später genauer als A- und P-Seite definiert. Sie fanden außerdem, daß eine Polyphenyl-tRNA auch ohne 30S Untereinheit an der 50S Untereinheit mit Puromycin reagieren kann.

Eine ganze Reihe von Untersuchungen befaßt sich mit den an der Proteinbiosynthese beteiligten Enzymen und Cofaktoren.

ARLINGHAUS et al. (1964) berichteten über zwei von Ribosomen ablösbare Proteine in Retikulozyten, die sie als Bindungsenzym (TF I) und Peptidsynthetase (TF II) bezeichneten.

SKOGERSON und MOLDAVE fanden 1968 im Rattenlebersystem, daß diese Enzyme auch für die Puromycinreaktion nötig sind; allerdings war nur dann, wenn die Aminoacyl-tRNA in der A-Seite angeheftet war, TF II (+GTP) nötig, mit endogener Peptidyl-tRNA in der P-Seite reagierte Puromycin ohne TF I, TF II und GTP.

Auch in Hefe (RICHTER und KLINK, 1967) und Bakterien (LUCAS-LENARD und HAENNI, 1968, RAVEL et al., 1968) konnten diese Transferenzyme gefunden und isoliert werden. Der TF I Faktor konnte genauer untersucht werden: Er besteht bei Bakterien aus den Untereinheiten T_u und T_s , die nach WEISBACH et al. (1970) in einem eigenen Zyklus die GTP-abhängige Anlagerung von Aminoacyl-tRNA in die A-Seite katalysieren.



(aus: SUHADOLNIK, S. 14)

Der Faktor TF II wird heute als Translocase bezeichnet.

McKEEHAN und HARDESTY (1969) und LIN et al. (1969) machten die Beobachtung, daß das GTP bei der Bindung von Phenyl-tRNA an das Ribosom nicht hydrolysiert wird, wenn man die Reaktion bei 0°C ablaufen läßt. Ein Peptidtransfer von der P-Seite auf die Phenylalanyl-tRNA oder Puromycin ist dann jedoch erst wieder nach Erwärmen auf 37°C möglich.

Nach HAENNI und LUCAS-LENARD (1968) sind T_s , T_u und GTP nötig für die Bindung von Phenylalanyl-tRNA an das Ribosom. Sind die Ribosomen vorher beladen mit N-acetyl-phenylalanyl-tRNA, so wird N-ac-di-phe-tRNA gebildet. Verwendet man das GTP analoge GMP-pCp, so wird die Bindung an das Ribosom gleichfalls durchgeführt, die Peptidbindung kann aber nicht mehr hergestellt werden. In beiden Fällen hört die Proteinbiosynthese bei der Bildung von Dipeptiden auf.

Wurde zu einem Ansatz, der mit N-ac-diphe-tRNA beladene Ribosomen und Faktoren T und GTP enthielt, Puromycin zugegeben, so wurden einige N-ac-di-phe-Puromycinmoleküle freigesetzt. Gab man den Translokationsfaktor G und GTP noch hinzu, wurden alle N-ac-di-phenylalanine mit Puromycin abgespalten: Vorher noch in der A-Seite lokalisierte Peptidyl-tRNAs konnten also nach Translokation in die P-Seite mit Puromycin reagieren.

Puromycin release of N-acetylPhe.

Additions	N-acetylPhe-puro released (C^{14} or H 3) (μ moles)
Puro	1.8
G + GTP + puro	5.4
G + GTP + fusidic acid + puro	2.0
G + GTP + GMP-PCP + puro	1.1
G + puro	2.0
GTP + puro	1.6

(aus: HAENNI und LUCAS-LENARD, S. 1366)

Diese Reaktion mit Puromycin war hemmbar durch Fusidinsäure, die den G-Faktor und die GTPase hemmt.

Im Anschluß wurde untersucht, wie Puromycin mit N-ac-phe-tRNA reagiert, die neben einer durch GMP-PCP gebundenen phe-tRNA ans Ribosom fixiert ist. Zwischen den beiden phe-tRNAs ist ja, wie schon erwähnt, eine Peptidbindung nicht möglich. Puromycin setzt hier nun N-ac-phe als N-ac-phe-Puromycin in gleichem Maße frei, wie es dies auch ohne gebundene phe-tRNA täte. Die phe-tRNA ist nach der Puromycinreaktion noch gebunden an das Ribosom nachweisbar.

Wurde GTP zur Bindung von phe-tRNA benutzt, tauchte N-ac-phe als N-ac-diphe zusammen mit dem phe der phe-tRNA auf. Eine Freisetzung durch Puromycin war nur dann möglich, wenn zusätzlich noch der Translokationsfaktor G und GTP vorhanden war.

Diese Befunde zeigen deutlich, daß es einen Unterschied gibt zwischen der Bindung der tRNA an das Ribosom (möglich mit GMP-PCP) und der Bindung mit anschließender Fähigkeit zur Peptidbindung (nur mit GTP). Ähnliche Ergebnisse fanden HERSHEY und THACH (1967) bei Versuchen zur Bindung und Reaktionsfähigkeit von fMet-tRNA.

Außerdem wird aus den Versuchen von HAENNI und LUCAS-LENARD deutlich, daß eine Kettenverlängerung nach einer stattgefundenen Peptidbindung nur dann möglich ist, wenn vorher mit Faktor G und GTP eine Translokation der Di-peptyl-tRNA von A nach P durchgeführt wird. Wichtig ist auch noch die Tatsache, daß die Wirksamkeit von Puromycin nicht dadurch beeinflußt wird, daß eine Aminoacyl-tRNA in

der A-Seite gebunden ist, wenn diese Bindung mit GMPPCP erfolgte. Offensichtlich kann GMPPCP das Aminosäureende der Aminoacyl-tRNA nicht in eine Position bringen, die eine Reaktion mit der Peptidyltransferase erlaubt. Das würde bedeuten, daß die A-Seite zwar besetzt wird, die S-Seite aber für Puromycin frei bleibt (s. COUTSOGEOG-POLOUS, S. 71).

Die Bedeutung des G-Faktor zeigten auch FELICETTI et al. (1969) an einem E. coli Stamm, der einen Defekt des G-Faktors hatte. In Gegenwart von Ribosomen, G-Faktor, GTP und Poly-U wurde Phenylalanyl-tRNA normal an das Ribosom gebunden. Isolierte und analysierte man nach einiger Zeit das Reaktionsprodukt, so enthielt es nur Dipeptide. Nach Zugabe von G-Faktor eines nicht mutierten Stammes (Wildtyp) fanden sich viel weniger Dipeptide, dafür aber entsprechend mehr Tripeptide und längere Oligopeptide. Mit Puromycin fand man, daß der mutierte Stamm an Poly-phe beladenen Ribosomen Poly-phe-Puromycin bilden konnte. Die Fähigkeit zur Peptidbindung war also vorhanden, es konnte aber nur eine einzige Bindung hergestellt werden. Zur Polymerisation ist daher ein funktionstüchtiger G-Faktor nötig.

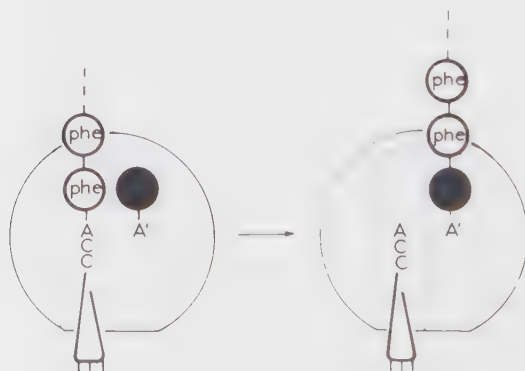
LUCAS-LENARD und HAENNI (1969) untersuchten, wann und wie die tRNA, die nach dem Peptidtransfer unbeladen in der P-Seite übrigbleibt, vom Ribosom abgespalten wird. - Während des Peptidtransfers auf die Aminoacyl-tRNA in der A-Seite bleibt die Donor-tRNA in der P-Seite gebunden. Setzte man einem Ansatz, der Ribosomen mit einer Peptidyl-tRNA in der A-Seite und einer entladenen tRNA in der P-Seite enthielt, den Elongationsfaktor G und GTP zu, nahm der Gehalt an gebundener Donor-tRNA rasch ab. Auch diese G-Faktor-abhängige Reaktion war durch Fusidinsäure hemmbar. GTP konnte durch GMPPCP nicht ersetzt werden.

Wurde statt Acceptor-tRNA Puromycin zugesetzt, änderte sich der Gehalt an ribosomal gebundener Donor-tRNA nicht, obwohl Peptide in großer Zahl auf Puromycin übertragen

wurden. Da nach der Puromycinreaktion keine Translokation stattfindet, weil keine Peptidyl-tRNA in der A-Seite gebunden ist, tritt auch der G-Faktor nicht in Aktion, der die Donor-tRNA freisetzt. Die Freisetzung der Donor-tRNA ist also mit der Translokation und mit ATP-Verbrauch gekoppelt.

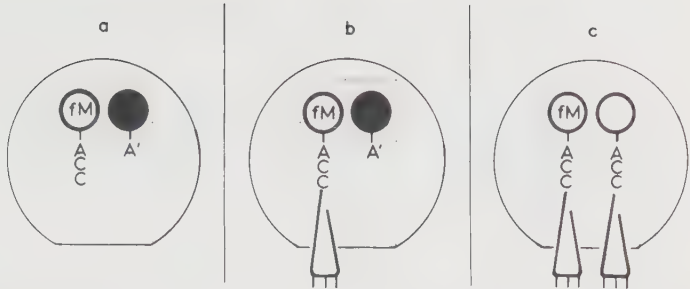
Auch auf die Bedeutung der Fragmentreaktion (MONRO und MARCKER, 1967; MONRO, 1967), sei hier nochmals kurz hingewiesen.

Nach Behandlung von Aminoacyl-tRNAs mit T_1 -RNase lassen sich Hexanukleotide isolieren, die die gleichen Funktionen ausüben können wie komplette tRNAs, mit der Ausnahme, daß die Koppelung zwischen mRNA- und Aminosäuresequenz aufgehoben ist. Die mRNA ist daher ganz überflüssig, ebenso wie die 30S Untereinheit, jedoch ist die Zugabe von Alkohol nötig. Die Proteine, die bei dieser Methode entstehen, haben eine zufällige Sequenz; ihr Gehalt an verschiedenen Aminosäuren entspricht etwa dem Konzentrationsverhältnis dieser Aminosäuren im Ansatz. Puromycin tritt in der Fragmentreaktion als Acceptor genauso auf, wie im kompletten Proteinbiosynthesesystem: Es setzt z.B. Formylmethionin, Acetylphenylalanin, Acetylleucin und Oligopeptide frei.



Reaktion von polyphenylalanyl-tRNA beladenen 50S-Ribosomen mit Puromycin

(aus: MONRO et al. 1969 b, S. 359)



Systems for the study of peptide bond formation with isolated 50S subunits in presence of alcohol. The substrate-ribosome complex is depicted at the moment before peptidyl transfer. a, CCA-(F-met) and puromycin (Monro, 1967; Monro et al., 1968); b, F-met-tRNA and puromycin (ibid.); c, F-met-tRNA and aminoacyl-tRNA (Monro, 1969).

(aus: MONRO et al. 1969 b, S. 360)

3. Versuche zur Termination

VOGEL et al. (1969) untersuchten die Rolle der Peptidyltransferase bei der Termination. Aus zwei Gründen hängt die Fähigkeit eines zellfreien Systems zur Termination von der Fähigkeit der 50S-Untereinheit, eine Peptidbindung herzustellen, ab: (1) gibt es bei Inaktivierung der Transferaseaktivität der 50S-Untereinheit keine Termination. Diese Inaktivierung ist in jeder gewünschten Abstufung durch schonende Methoden wie Temperaturänderung oder Änderung der Ionenkonzentration möglich; (2) werden durch Hemmung der Transferase mit Antibiotika (Chloramphenicol, Sparsomycin) beide Fähigkeiten gleichermaßen unterdrückt und kehren nach Reaktivierung in gleichem Ausmaß wieder. Der Grad der Hemmung der Transferase- und der Terminationsrate gehen genau parallel der Antibiotikakonzentration. Dies weist auf die Beteiligung einer Komponente der 50S-Untereinheit hin, die an der Peptidbindung beteiligt ist. Es scheint so zu sein, daß bei der Termination die Transferase modifiziert wird und anschließend die Peptidkette von der Peptidyl-tRNA in der

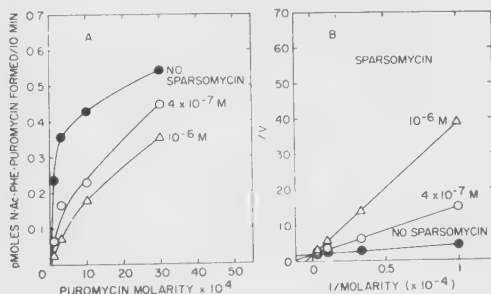
P-Seite auf Wasser anstatt auf eine Aminoacyl-tRNA überträgt. In diesen Versuchen wurde Puromycin eingesetzt, um die Freisetzung von fMet-Puromycin - als Maß für die Peptidyltransferaseaktivität - der Freisetzung von fMet-Methionin durch die Terminationsfaktoren gegenüberstellen zu können.

Die Wirkung verschiedener Antibiotika auf die Puromycinreaktion

TANAKA et al. (1971) untersuchten den Effekt von Antibiotika, die an der 50S-Untereinheit wirken, auf die Synthese von Peptidyl-Puromycin. Auffallend war dabei, daß die Makrolithantibiotika Erythromycin und Oleandomycin ausschließlich die Synthese von Diphenylpuromycin hemmten, aber keinen Einfluß auf die Synthese von Glycylphenylalanyl-Puromycin oder Leucylphenylalanyl-Puromycin hatten. Chloramphenicol und Lincomycin dagegen hatten nur eine sehr geringe Hemmwirkung auf die Synthese von Diphenylalanyl-Puromycin und Leucylphenylalanyl-Puromycin.

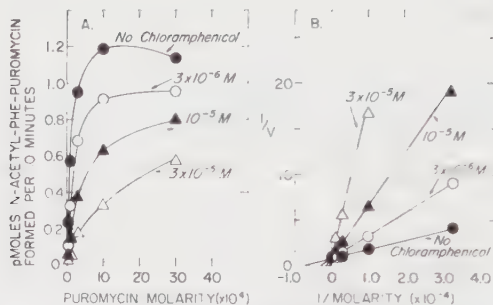
PESTKA (1970) testete den Einfluß von 13 Antibiotika auf die Synthese von N-acetylphenylalanyl-Puromycin in einem zellfreien System aus *E. coli*.

Aus den Ergebnissen mit Chloramphenicol und Sparsomycin kann man schließen, daß diese Antibiotika die Puromycinreaktion kompetitiv hemmen.



A. Effect of sparsomycin on the rate of N-acetyl-phenylalanyl-puromycin formation as a function of puromycin concentration. Each 0.050-ml reaction mixture contained the following components: 0.06 M Tris-acetate, pH 7.2; 0.02 M magnesium chloride; 0.08 M KCl; 0.14 M ammonium chloride; 26 nmoles of base residues of poly U; 2.3 A₂₆₀ units of ribosomes; puromycin concentration as given on the abscissa; 2.2 pmoles of N-acetyl-[³H]Phe-tRNA (0.54 A₂₆₀ unit); and 0, 4 x 10⁻⁷ or 1 x 10⁻⁶ M sparsomycin as indicated. Reactions were incubated for 10 min at 30°. ●, no sparsomycin; ○, 4 x 10⁻⁷ M sparsomycin; △, 10⁻⁶ M sparsomycin. B. Lineweaver-Burk plot of the data of Fig. A.

(aus: PESTKA, 1970a, S.85)



A. Effect of chloramphenicol on the rate of *N*-acetyl-phenylalanyl-puromycin formation as a function of puromycin concentration. Each 0.050-ml reaction mixture contained the following components: 0.05 M Tris-acetate, pH 7.2; 0.08 M KCl, 0.14 M ammonium chloride; 0.02 M magnesium chloride; 2.3 A_{260} units of ribosomes; 1.8 pmoles of *N*-Ac-[14 C]Phe-tRNA (0.14 A_{260} unit); puromycin concentration as given on the abscissa; 0, 3×10^{-6} , 10^{-5} , or 3×10^{-5} M chloramphenicol where indicated. Reactions were performed at 37° for 10 min. B. Lineweaver-Burk plot of the data in Fig. 12A. $\bullet$, no chloramphenicol; $\circ$, 3×10^{-6} M chloramphenicol; $\blacktriangle$, 10^{-5} M chloramphenicol; $\triangle$, 3×10^{-5} M chloramphenicol.

(aus: PESTKA, 1970a, S.86)

Es kann sein, daß Sparsomycin die Peptidyl-tRNA so an das Ribosom bindet, daß eine Reaktion mit Puromycin ausgeschlossen ist (s. MONRO et al., 1969). Chloramphenicol ist eventuell ein Analog für das Peptidyl-adenylyl-ende der Peptidyl-tRNA (COUTSOGEOGROPOULOS, 1966) oder nach Pestka auch ein kompetitiver Inhibitor für Aminoacyl-tRNA, besonders des Aminoacyladenlylendes einer beladenen tRNA. Dadurch würde Chloramphenicol die Anlagerung von Aminoacyl-tRNA und auch von Puromycin an das Ribosom hemmen.

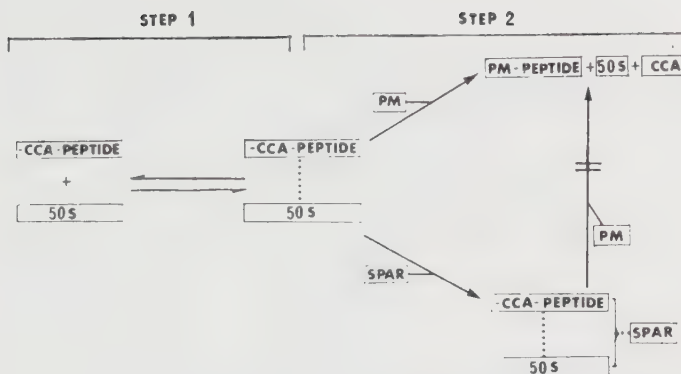
Hier sei kurz auf eine Arbeit hingewiesen, in der ein etwas anderer Mechanismus des Peptidtransfer von der A- in die P-Seite beschrieben wird. Aufgrund von Versuchen mit Kalottenmodellen kam RAACKE (1971) zu der Überzeugung, daß ein direkter Transfer der Peptidkette von der Donor-tRNA auf die Aminoacyl-tRNA nicht möglich ist, da die beteiligten Carboxyl- und Aminogruppen keinen räumlichen Kontakt haben können, der Voraussetzung für eine Peptidbindung wäre. Es wird vorgeschlagen, daß die 5S-RNA, die Bestandteil der 50S-Untereinheit ist, immer als Donor der Peptidkette auftritt, und diese nach Übertragung auf die Aminoacyl-tRNA wieder zurückbekommt. Die entladene tRNA kann dann sofort wieder ausgetauscht werden. Die 5S-RNA wäre etwa zwischen der A- und P-Seite lokalisiert. Sie würde abwechselnd von einer Transferase I den Peptidylrest abgenommen bekommen, und dann von einer Transferase II um eine Aminosäure verlängert zurückerhalten. Diese Transferasen müßten jeweils das Ende der tRNA und der 5S-RNA erkennen können. - Die Puromycinreaktion läuft in diesem Modell im Prinzip wie herkömmlich angenommen ab, nur daß als Donor nicht die Peptidyl-tRNA, sondern die Peptidyl-5S-RNA auftritt. Chloramphenicol aber, darum sei dieses Modell hier erwähnt, ist nach RAACKE ein Analog des Peptidyluridins, des Endes der 5S-RNA, das in diesem Modell funktionell dem Ende der Peptidyl-tRNA entspricht, das nach PESTKA dem Chloramphenicol analog sein soll. Da die Transferase beide RNAs

erkennen kann, müßte sie auch für die Analogen Puromycin und Chloramphenicol empfindlich sein. Dies würde die kompetitive Hemmung beider Antibiotika erklären.

In einer anderen Arbeit schlug PESTKA (1972) ein ebenfalls neues und asymmetrisches Ribosomenmodell vor. Aufgrund von Untersuchungen der Wirkung einer ganzen Reihe von Antibiotika auf die Puromycinreaktion ergaben sich Schlußfolgerungen, die mit der herkömmlichen Vorstellung von Peptidtransfer und Translokation nicht voll in Einklang zu bringen sind.

MONRO et al. (1969a) fanden bei Untersuchungen der Wirkung von Sparsomycin auf die Puromycinreaktion, daß dieses Antibiotikum wahrscheinlich einen Komplex zwischen den Peptidyl-CCA-Rest einer tRNA und der 50S-Untereinheit induziert, der sehr stabil ist, und nicht weiter reagieren kann. Wurde mit Sparsomycin vorinkubiert, konnte kein Peptidyl-Puromycin freigesetzt werden, wurde mit Puromycin vorinkubiert, fand sich nur wenig Einbau in den oben erwähnten stabilen Komplex. Bei gleichzeitiger Gabe der beiden Antibiotika reagierte das Peptidyl-tRNA-Oligonukleotid zum Teil mit Puromycin, zum Teil mit Sparsomycin.

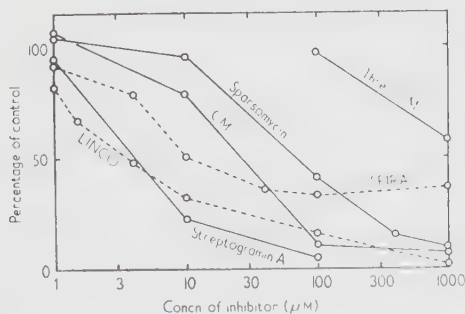
MONRO et al. stellten die mutmaßliche Wirkung von Sparsomycin und ihre Beziehung zur Puromycinreaktion folgendermaßen dar:



Hypothetical scheme to explain results. For discussion see text.

(aus: MONRO et al. 1969 a, S. 358)

MONRO und VAZQUEZ (1967) testeten die Wirkung von Antibiotika auf die Fragmentreaktion im *E. coli* System. Als Donor wurde dabei N-fMethionyl von einem Hexanukleotid auf Puromycin übertragen. Die untersuchten Antibiotika wurden in mehreren unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt, die Abhängigkeit des Hemmungsgrades von der Konzentration zeigt die folgende Abbildung.



Effects of concentration of selected inhibitors on the fragment reaction (same conditions as in Table I). Abbreviations used in Figure are: CM, chloramphenicol; LINCO, linecomycin; SPAR, spiramycin III.

(aus: MONRO und VAZQUEZ, S. 162)

Die unterschiedliche Hemmung zeigt, wie spezifisch die einzelnen Antibiotika an verschiedenen Stellen den Peptidtransfer hemmen. 1970 konnten diese Autoren den Einfluß der Antibiotika auf die Fragmentreaktion im System aus menschlichen Tonsillen prüfen und mit den Ergebnissen aus *E. coli* vergleichen. Dabei fanden sie erstaunliche Unterschiede: (NETH et al.1970)

Effects of antibiotics on the fragment reaction with *E. coli*, yeast and tonsil ribosomes

Antibiotic	Reaction with tonsil ribosomes (as % of control) in presence of 1mM antibiotic	Concentration (μ M) of antibiotic giving 50% inhibition with ribosomes from		
		<i>E. coli</i>	yeast	tonsils
Chloramphenicol	c 100	20	inactive	inactive
Lincomycin	c 100	3	inactive	inactive
Spiramycin III	c 100	15	inactive	inactive
Anisomycin	15	inactive	1	10
Tenuazonic acid	54	inactive	>1000	1000
Sparsomycin	0	50	5	10
Amicetin	30	40	1000	100 1000
Gougerotin	15	30	10	100
Cycloheximide	c 100	inactive	>1000	inactive

(aus: NETH et al., S. 200)

Gemeinsam ist allen drei Systemen (zusätzlich wird noch Hefe betrachtet), daß die Peptidyltransferase auf der größeren der beiden Ribosomenuntereinheiten lokalisiert ist, daß die Aktivität der Transferase die Anwesenheit der kleinen Untereinheit und mRNA oder in der Fragmentreaktion die von Alkohol erfordert, und daß die Antibiotika Sparsomycin, Amicetin und Gougerotin die Transferaseaktivität hemmen.

Die Antibiotika Chloramphenicol, Lincomycin und Spiramycin A hemmen nur die Aktivität der Transferase in Bakterien. Dies ist eine Vorbedingung für einen Einsatz in der Medizin als Chemotherapeutikum. Anisomycin ist das einzige dieser Antibiotika, das spezifisch auf eukaryote Systeme wirkt. Das Versagen des Cycloheximids in dieser Untersuchung wird wahrscheinlich auf dem Fehlen irgendeines Teils in der Fragmentreaktion beruhen, der zur Wirkung nötig ist.

KUBOTA et al. berichten 1972 von der Wirkung verschiedener Antibiotika auf die Synthese von fMet-Puromycin und fMet-ala-Puromycin im zellfreien System aus *E. coli*. Mikamycin B stimulierte die fMet-Puromycinsynthese, hemmte aber die Synthese des fMet-ala-Puromycin. Dies bedeutet eine Hemmung der zweiten Peptidbindung. Beide Peptidbindungen wurden gehemmt bei Mikamycin A, Spiramycin und Blasticidin S. Mikamycin B bindet sich an die 50S-Untereinheit und könnte die Peptidyltransferase so ändern, daß es die erste Peptidbindung stimuliert, die folgenden aber hemmt. Daß die Reaktion, die zur Bildung der ersten Peptidbindung führt, von besonderer Art ist, hatten ja auch schon SMITH et al. (1965) (s.S. 65) vermutet. KUBOTA et al. erwägen auch die Möglichkeit, daß eventuell zwei verschiedene Transferasen die Peptidbindungen knüpfen (s. RAACKE, 1971; PESTKA, 1970).

Die Wirkung von Puromycin auf das Gedächtnis

FLEXNER et al. (1962) untersuchten die Proteinbiosynthese in Mäusehirn nach Gaben von Puromycin. Sie fanden einen um durchschnittlich 80 % verminderten Einbau von Valin in die Proteine der Hirnrinde. Einen direkten Einfluß auf die Lern- oder Gedächtnisleistung konnten sie nicht zeigen, da ein Teil der Mäuse durch intracerebrale Injektionen Desorientierung beim Lern- und Nachtestversuch zeigte.

1963 gelang es FLEXNER et al. einen Gedächtnis-hemmenden Effekt von Puromycin zu zeigen. Dieser konnte in einer ganzen Serie von Arbeiten näher beschrieben werden:

- der Effekt ist Dosis-abhängig (FLEXNER et al., 1965a)
- Puromycinderivate, die keine Proteinbiosynthesehemmung hervorrufen, z.B. Aminonukleosid oder hydrolysiertes Puromycin, sind ohne Wirkung auf das Gedächtnis (FLEXNER, 1965b)
- der Puromycineffekt ist durch gleichzeitige Gabe von Acetoxycycloheximid hemmbar (FLEXNER und FLEXNER, 1966)
- Peptidylpuromycin wird im Gehirn angehäuft und kann wochenlang nachgewiesen werden (FLEXNER und FLEXNER, 1968a)
- das führt zu einem Anschwellen der neuronalen Mitochondrien (GAMBETTI et al., 1968)
- Neutralisation von Puromycin mit K^+ , Li^+ , Ca^{++} oder Mg^{++} unterdrückte den amnestischen Effekt (FLEXNER und FLEXNER, 1969b)
- der Gedächtnisverlust bei Puromycingabe 24 Std. nach dem Lernprozess war reversibel durch intracerebrale Injektion von physiologischer Kochsalzlösung oder Wasser (FLEXNER und FLEXNER, 1967, 1969a, 1970)
- Kochsalzinjektionen während des Trainings können die Gedächtnisleistung jedoch nicht erhalten (FLEXNER und FLEXNER, 1968b).

Diese Beispiele von Befunden sollen genügen, die Vielfalt der Wirkung von Puromycin in vivo auf das Gehirn zu veranschaulichen.

Zusammenfassend beruht nach FLEXNER et al. (1971) die Blockierung des Gedächtnisses auf einer Anhäufung von Peptidylpuromycin in den Synapsen des Gehirns. Dafür spricht, (1) daß die größte Konzentration von Peptidylpuromycin nach 10-20 Std. gerade zu der Zeit auftritt, zu der das Gedächtnis verschwindet, (2) daß Cycloheximid die Bildung des Peptidylpuromycins und den Gedächtnisverlust verhindert, und (3) daß das Peptidylpuromycin über lange Zeit in den Synaptosomen nachweisbar ist, jedoch bei intracerebraler Injektion von Wasser dort verschwindet, wobei das Gedächtnis, bzw. die Erinnerung wiederkommt.

Eine ausführliche Zusammenfassung des Effektes von Puromycin auf das Gedächtnis geben GIBBS und MARK (1973).

Puromycin und Enzymsynthese

NEMETH und DE LA HABA untersuchten 1962 die Wirkung von Puromycin auf die Aktivität der Tryptophanpyrrolase. Puromycin hemmte bei einer Konzentration, bei der Proteinsynthese zu 98 % gehemmt ist, den normalen Anstieg dieses Enzyms in der Leber neugeborener Meerschweinchen und hemmte zu 70 % den adaptiven Anstieg in erwachsenen Tieren nach Injektion von Tryptophan. Es scheint so zu sein, daß nach Geburt die Bildung von neuem Enzym aus Aminosäuren normalerweise den Pyrrolaseaktivitätsanstieg verursacht, während der adaptive Anstieg bei erwachsenen Tieren zum Teil durch Enzymsynthese verursacht wird und zum Teil auf der Aktivierung von bestehenden Vorstufen beruht.

ADAMSON et al. (1966) fanden, daß Puromycin den Transport einiger Aminosäuren im embryonalen Hühnerknochen hemmt. Diese Hemmung ist reversibel. Es wird vermutet, daß sie auf der Hemmung der Synthese einiger Proteine, die für den Aminosäuretransport oder für die Aufrechterhaltung der dafür erforderlichen Bedingungen nötig sind, beruht.

In Versuchen von MOOG (1964) sollte die Möglichkeit untersucht werden, ob ein Aktivitätsanstieg der alkalischen Phosphatase des Duodenums auf eine schnelle Synthese neuer Enzymmoleküle zurückzuführen sei. Zu diesem Zweck wurde die Proteinsynthese durch Puromycin und die mRNA-Synthese durch Actinomycin, das durch Einschleiben zwischen die Basen der DNA die Transkription durch die RNA-Polymerase verhindert, gehemmt. Beide Antibiotika hemmen den Aktivitätsanstieg in reifem Gewebe. Bei den hier verwendeten zwei Wochen alten Mäusen zeigte sich etwas anderes: die Aktivität war nach Gabe der Antibiotika zwei- bis dreimal größer als in unbehandelten Tieren. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Jejunum und der Niere wurde nicht beeinflusst. Eine Erklärung für diese Aktivitätssteigerung könnte sein, daß die Antibiotika die Produktion eines Proteins hemmen, das die Umwandlung schon existenter Enzymmoleküle in einen aktiven Zustand verhindert. Diese Deutung kann aber auch nicht erklären, warum auch das Aminonukleosid, das die Proteinsynthese nicht hemmt, eine Aktivitätssteigerung hervorruft.

Ort der tRNA-Synthese

An Zellkulturen aus Speicheldrüsen, die in einem synthetischen Medium mit (^{14}C -Methyl-) Methionin wuchsen, konnten SIRLIN et al. (1963) zeigen, daß Puromycin den Einbau des radioaktiven Isotops in das Cytoplasma, jedoch nicht in den Nucleolus hemmt. Durch Ribonuklease konnte die Radioaktivität aus dem Nucleolus entfernt werden. Die markierte RNA wurde hydrolysiert und chromatographiert. Es zeigte sich, daß die markierte Methylgruppe vom Methionin auf die RNA übertragen worden war. Methionin trat also hier als Donor für die Methylgruppen auf, die in Form der methylierten Basen charakteristisch für die tRNA sind. Die Methylierung im Nucleolus unterstreicht die Bedeutung des Kernes für die tRNA-Synthese.

Puromycin und Glykoproteine

MOLNAR et al. untersuchten 1964, wie Glukosamin in einem zellfreien System aus Rattenleber von einer Fraktion, die bei dem Zellaufschluß im Sediment erscheint, in Glykoproteine eingebaut wird. Puromycin wurde eingesetzt, um zu zeigen, ob der Einbau von der Neusynthese des Proteinanteils abhängt. Puromycin hemmt den Einbau des Glukosamins in Leber- und Plasmaproteine und führte zu einer Anhäufung säurelöslicher Glukosaminzwischenprodukte, die identifiziert werden konnten.

Eng im Zusammenhang damit stehen Untersuchungen von O'BRIEN et al. (1966) über die Anlagerung der N-acetylneuraminsäure (NANA) an Acceptorproteine an Mikrosomen aus Rattenleber. Puromycin hemmt zu 85 % die Übertragung von NANA auf diese Acceptoren, wenn es den Versuchstieren 45 min vor Entnahme der Leber injiziert wurde. Das Reaktionsprodukt bleibt an die Mikrosomen gebunden, ist aber durch Detergenzien ablösbar. Durch immunologische Vergleichsmethoden zeigte sich, daß der Acceptor aus Vorstufen von Plasmaproteinen besteht, denen die NANA-Gruppe fehlt.

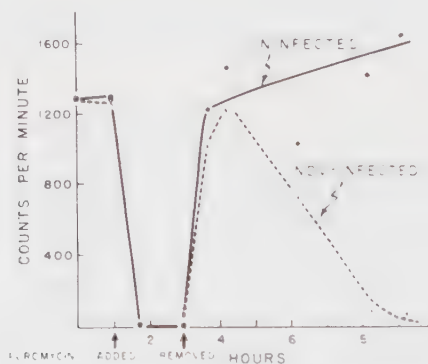
Nach DE LA HABA und HOLTZER (1965) ist die Synthese von Chondroitinsulfat (CSA) eng verbunden mit der Proteinsynthese, da Puromycin auch den Einbau von Sulfat und Glukose in das Polysaccharid verhindert. Gemessen wurde der Einbau von ^{14}C -Glukose und ^{35}S -Sulfat in CSA und zum Vergleich der von ^{14}C -Valin in Protein. Der Einbau aller drei Testsubstanzen wurde durch Puromycin gleichzeitig und in vergleichbarem Ausmaß gehemmt. Das zeigt die Koppelung zwischen CSA und Proteinsynthese. Da CSA nur gekoppelt an Protein vorkommt, scheint es einen Feedbackmechanismus zu geben, der die Anhäufung von proteinfreiem CSA durch Hemmung der CSA-Synthese verhindert.

MURATA et al. (1967) fanden, daß Puromycin den Einbau von Acetat in Gesamtlipide, nicht veresterte Cholesteride und

saure Mucopolysaccharide abhängig von seiner Konzentration hemmt. Die Untersuchungen wurden mit Zellkulturen aus Hühneraorta durchgeführt. Die Hemmwirkung war in späteren Generationen der Zellen größer (52 %) als zu Beginn (26 %). Welcher Mechanismus dem zugrunde liegt, ist unklar. Möglicherweise fehlen Proteine oder Lipoproteine als Enzyme oder Cofaktoren.

Puromycin in der Virologie

WHEELOCK (1962) untersuchte die Proteinsynthese während der Eklipse, der Zeit zwischen Infektion einer Zelle mit einem Virus und dem ersten Auftreten neuen Virusantigens. In HeLa-Zellen wurde durch Puromycin die Synthese von viralem Antigen und zellulären Proteinen vollständig gehemmt. Nach Absetzen von Puromycin lief die Synthese beider Proteingruppen wieder an.



Effect of addition and removal of $10^{-6} M$ puromycin on protein synthesis in uninfected and NDV-infected HeLa cells.

(aus: WHEELOCK, S. 1361)

Die Eklipse, die bei dem hier untersuchten New Castle Disease Virus (NDV) ungefähr zwei Stunden dauert, konnte durch Puromycin auf 12 Stunden ausgedehnt werden. Wur-

den Zellen vier Stunden lang nach der Infektion mit Puromycin behandelt, konnten sie anschließend nach Weglassen von Puromycin in einer halben Stunde soviel Virusantigen bilden, wie es Zellen normalerweise erst innerhalb von zwei Stunden können. Wahrscheinlich beruht dies darauf, daß während der Puromycinbehandlung soviel virale mRNA gebildet wurde, daß die Proteinsynthese nach Entfernen von Puromycin auf Hochtouren laufen konnte und ausschließlich virale Antigene bildete. Im anderen Fall nimmt die Menge an mRNA nur langsam zu und die Produktion einer gleichen Menge des Virusantigens dauert länger. Wird Puromycin nach der Infektion nur eine Stunde lang den Zellen zugesetzt, wird die Dauer der Eklipse nicht beeinflußt. In dieser Zeit spielt die Proteinsynthese anscheinend noch keine Rolle, es müssen erst die Vorbedingungen zur Produktion viraler Antigene geschaffen werden.

Nach KIT (1963) kann das Enzym Thymidinkinase in Mäusefibroblasten durch Infektion mit Vacciniavirus induziert werden. Diese Induktion ist hemmbar durch Gabe von Puromycin. Im Zusammenhang mit der Wirkung eines anderen Inhibitors (p-Fluorophenylalanin) konnte gezeigt werden, daß die Neusynthese von Thymidinkinase bei der Induktion eine Rolle spielt.

ACKERMANN et al. (1965) setzten Puromycin ein, um die Synthese von Histonen in HeLa-Zellen zu hemmen. Damit sollte durch vermehrte Freilegung von DNA deren Replikationsrate erhöht werden. Die DNA-Synthese wurde jedoch durch die Hemmung der Replikationsenzyme noch verringert. Durch Infektion mit Poliovirus kann die zelluläre DNA-Konzentration über eine Stimulierung der Histonproduktion gehemmt werden. Das Antibiotikum Canavanine kann diese Stimulierung unterdrücken und die Hemmung der DNA-Synthese aufheben, während Puromycin dies nicht kann, da es durch seine generelle Proteinbiosynthesehemmung wieder die Produktion der notwendigen DNA-Polymerasen stört.

Nach NEWTON (1965) läßt sich zeigen, daß die Induktion der Thymidinkinase nach Infektion von Mäusezellen mit Herpesviren durch Puromycin gehemmt werden kann, da es sich hier um die Neusynthese von Enzym handelt. Die Aktivität der Desoxyribonuklease II wird durch die Gegenwart von Puromycin nicht beeinflußt; wahrscheinlich wird dabei ein schon vorher gebildetes Enzym aktiviert.

WAGNER und HUANG fanden 1965, daß Puromycin die Synthese von Interferon in NDV-infizierten Mäuseasitzeszellen in allen Stadien reversibel hemmt. Ähnlich den Ergebnissen von WHEELOCK wurde die Dauer zwischen Infektion und Auftreten von Interferon nach Wegnahme von Puromycin verkürzt. Wird die Translation der Interferon-mRNA durch Puromycin verhindert und nach einiger Zeit die Synthese von mRNA durch Actinomycin gestoppt, kann man aus der Menge von Interferon, die nach Auswaschen von Puromycin gebildet wird, auf die mRNA-Syntheserate schließen. Entsprechende Resultate brachten auch Versuche von BUCHAN und BURKE (1965, 1966).

Eine Arbeit von LITTLEFIELD¹ aus dem Jahre 1965 befaßt sich mit den Zusammenhängen zwischen DNA- und Proteinsynthese und der Rolle der Histone. Gibt man zu teilweise synchronisierten Zellen von HeLa Kulturen o.a. während der DNA-Synthese Puromycin zu, wird außer der Proteinsynthese auch die DNA-Synthese gehemmt. Die DNA-Synthese ist wahrscheinlich auf gleichzeitige Proteinsynthese angewiesen. Die Histone z.B. könnten gleichzeitig mit der DNA synthetisiert werden und nötig sein, die neugebildete DNA zu stabilisieren. Für diese Deutung spricht, daß z.B. E. coli Zellen nur wenig Histone enthalten, und auch nicht auf begleitende Proteinsynthese angewiesen sind.

¹ und JACOBS

Puromycin und Hormone

Die Rolle der Proteinsynthese bei der frühen Östrogenwirkung war das Thema einer Arbeit von MUELLER et al. (1961) an ovariectomierten Ratten. Puromycin hemmte die Proteinsynthese, aber nicht die von Phospholipiden und RNA. Auch der Anstieg der RNA- und Phospholipidsynthese und die Einlagerung von Wasser in den Uterus nach Östrogengabe wurde verhindert. Letzteres spricht gegen einen direkten Einfluß von Östrogen auf die Permeabilität der Zellmembranen. Es bleibt ungeklärt, wie Östrogen die Proteinsynthese stimuliert.

Drei Artikel aus den Jahren 1964, 1965 und 1969 befassen sich unter anderem mit dem Effekt von Puromycin auf die Insulinwirkung.

FAIN untersuchte 1964 Fettgewebe von Ratten. Puromycin hemmte darin die Aufnahme und Umwandlung von Glucose zu CO_2 , Glyceriden und Fettsäuren und den Einbau von Glucose und Fructose in Proteine. Puromycin hatte keinen direkten Einfluß auf den Stoffwechsel des Pyruvats, konnte aber die Wirkung des Insulins stark vermindern, welches sonst die Reaktion von Pyruvat zu Lactat vermindert, und die von Lactat zu Fettsäuren stimuliert. Die Proteinsynthese wurde auch in Gegenwart von Insulin gehemmt.

DAWSON und BECK untersuchten 1965 das Fettgewebe des Nebenhodens der Ratte. Die Oxidationsrate von Glucose zu CO_2 wird durch Puromycin halbiert. Auf die 2-3fache Stimulation der Oxidation durch Insulin hat Puromycin jedoch nur einen sehr geringen Einfluß. Ähnlich ist es bei der Lipidsynthese: Eine geringe Hemmung ist zu bemerken, der Einfluß auf die Insulin-stimulierte Synthese ist aber gering. Welche Einflüsse zu diesen Befunden führen, ist schwer abzuschätzen; eventuell spielt die Aktivierung der Glykogenolyse eine Rolle.

In Frostmuskel hemmte Puromycin die stimulierende Wirkung von Insulin auf den O_2 -Verbrauch nur, wenn kein Lactat zugegeben wurde (GOURLEY und BRUNTON, 1969); wurde

Lactat zugegeben, stimulierte Puromycin die Oxidation von Lactat und seinen Einbau in Glykogen. Dieser Effekt ist dem des Insulins ähnlich, und beide konnten sich addieren.

SCHARFF und WOUL (1965) beschrieben die Anhäufung von Aminosäuren in perfundiertem Rattenherzmuskel. Diese Anhäufung trat auf, wenn Insulin zusammen mit Puromycin gegeben wurde. Es wird vermutet, daß Insulin neben dem Effekt, die Proteinsynthese zu stimulieren, auch für ein größeres Aminosäureangebot sorgt, indem es deren Transport beschleunigt. Wird die Proteinsynthese durch Puromycin unterdrückt, häufen sich die vermehrt herbeigebrachten Aminosäuren an.

NITOWSKY und HERZ (1963) untersuchten den Einfluß von Cortikoiden auf die Aktivität der alkalischen Phosphatase in menschlichen Leukozyten. Wurde Prednisolon zugegeben, kam es nach 24 Std. zu einem deutlichen Anstieg der Aktivität auf das 4fache, die nach 48 Std. ihren Höhepunkt erreichte. Diese Aktivitätszunahme blieb unter Zusatz von Puromycin wesentlich geringer. Das spricht für eine Enzyminduktion mit Neusynthese von Enzymmolekülen.

NOODEN und THIMANN (1963) untersuchten die Bedeutung der Proteinsynthese bei der Auxin-induzierten Zellvergrößerung (Auxin ist ein pflanzlicher Wachstoffsstoff). Sie fanden, daß der Einbau von Leucin in Protein unter Auxinwirkung nicht wesentlich beschleunigt war, im Gegensatz zum normalen Zellwachstum, das mit einer beachtlichen Proteinsynthese einhergeht. Chloramphenicol und Puromycin hemmen das Auxin-abhängige Zellwachstum. Die Wirkungsstelle von Auxin scheint ein Nukleinsäuresystem zu sein, das die Synthese eines essentiellen Proteins kontrolliert.

Puromycin und Blutgerinnung

Bei der Synthese des Blutgerinnungsfaktors VII spielt Vitamin K eine wichtige Rolle. Fehlt es, kann der Faktor nicht gebildet werden. Auch durch Vitamin-K-Antagonisten wird die Synthese unterdrückt. Das macht man sich z.B. in der Prophylaxe der Blutgerinnungsbildung zunutze.

Wie Vitamin K die Synthese des Faktors VII beeinflusst, wurde von BABIOR 1966 untersucht. Obwohl Puromycin die Proteinsynthese zu 98 % hemmte, wurde die Produktion von Faktor VII kaum beeinflusst. Daraus kann man schließen, daß in einer Reaktion, die von Puromycin nicht beeinflusst werden kann, bestimmte Vorstufen zu Faktor VII umgewandelt werden. Diese Umwandlung ist Vitamin K abhängig. Nur der geringe beeinflussbare Anteil wird durch de novo Synthese erzeugt.

Ein Einfluß von Puromycin auf die Synthese von Plasmaalbumin und Fibrinogen untersuchten JOHN und MILLER 1969. Puromycin stoppte den Einbau von radioaktiv markierten Aminosäuren in Plasma- und Lebereiweiß. Der Gehalt von Albumin und Fibrinogen im Perfusat stieg noch etwa 2 Std. lang nach Puromycingabe an. Bis dahin wurden fertige Plasmaproteine noch aus der Leber freigesetzt.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Anwendung von Puromycin trug bei zur Lösung folgender Probleme:

A) Initiation:

Unterschiedliche Affinität der Met-tRNA's zu A- und P-Seite des Ribosoms (S.91)
Bedeutung der Formylgruppe (S.92)
Rolle der Initiationsfaktoren (S.93)
Bindung und Decodierung von mRNA und tRNA (S.93)
Universalität des genetischen Codes (S.93)
Bedeutung des Jonenmilieus für die Proteinsynthese (S.94)
Deformylierung (S.94)
Vorrang des tRNA-Anteils gegenüber der Aminosäure für die Wirkung einer AA-tRNA als Initiator-tRNA (S.94)

B) Elongation:

Ort der Proteinsynthese (S.95)
Existenz von zwei Bindungsstellen für tRNA (S.96)
Rolle des GTP bei einzelnen Syntheseschritten (S.97)
Bedeutung und Zyklus der Elongationsfaktoren (S.97)
Bedeutung der Translokation und des G-Faktors (S.98)
Freisetzung der Donor-tRNA aus der P-Seite (S.99)
Fragment-Reaktion (S.100)

C) Termination:

Bedeutung und Modifizierung der Peptidyltransferase bei der Termination (S.101)

D) Andere Antibiotika

Puromycinreaktion als Modell der Proteinsynthese (S.103)
Gegenseitige Beeinflussung von Puromycin und anderen Antibiotika, insbesondere Chloramphenicol (S.103) und Sparso-mycin (S.106)
Neue Proteinsynthesemodelle (S.105)
Unterschiedliche Antibiotikawirkung in verschiedenen Proteinsynthesystemen (S.108)
Besondere Bedingungen bei der ersten Peptidbindung (S.109)

E) Gedächtnis:

Einfluss auf die Synapsen (S.110)

F) Enzymsynthese:

Unterscheidung von Neusynthese und Modifizierung von Vorstufen (S.111)

Beeinflussung übergeordneter, proteinsyntheseabhängiger Regelsysteme (S.112)

G) Ort der RNA-Synthese (S.112)

H) Synthese von Glykoproteinen:

Regelung der Synthese des Proteinanteils von Acetylneuraminsäure und Chondroitinschwefelsäure (S.113)

I) Virologie:

Bedeutung der Proteinsynthese in der Eklipse (S.114)

Interferonsynthese (S.116)

J) Hormonwirkung:

Östrogene, Insulin, Corticoide, Auxin (S.117)

K) Hämatologie (S.119)

Plasmaproteinsynthese in der Leber;

Vitamin K und Faktor VII

LITERATUR

- Ackermann, W.W., Cox, D.C. und Dinka, S.
 Biochem. Biophys. Res. Comm. 19, 745, (1965)
- Adamson, L.F., Langeluttig, S.G. und Anast, C.S.
 Biochim. Biophys. Acta 115, 355, (1966)
- Agosin, M., von Brand, T.
 Antibiot. and Chemotherapy 4, 624, (1954)
- Allen, E.H. und Schweet, R.S.
 J. Biol. Chem. 237, 760, (1962)
- Allen, D.W. und Zamecnik, P.C.
 Biochim. Biophys. Acta 55, 865, (1962)
- Appleman, M.M. und Kemp, G.
 Biochem. Biophys. Res. Comm. 24 564, (1966)
- Arlinghaus, R., Shaeffer, J. und Schweet, R.
 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 51, 1291. (1964)
- Babior, B.M.
 Biochim. Biophys. Acta 123, 606, (1966)
- Baker, B.R., Schaub, R.E. und Williams, J.H.
 J. Amer. Chem. Soc. 77, 7, (1955a)
- Baker, B.R., Joseph, J.P. und Williams, J.H.
 J. Amer. Chem. Soc. 77, 1, (1955b)
- Bishop, J.O.
 Arch. Biochem. Biophys. 125, 449, (1968)
- Blobel, G. und Sabatini, D.
 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 390, (1971)
- Borowsky, B.A., Kissner, D.M. und Recant, L.
 Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 97, 857, (1958)
- Bortle, L. und Oleson, J.J.
 Antibiotics Ann. 1954/55, 770
- Bosch, L. ed.: The Mechanism of Protein Synthesis and
 its Regulation, Amsterdam, New York 1972
- Bresch, C. und Hausmann, R. : Klassische und molekulare
 Genetik, 3. Aufl., Berlin 1972
- Bretscher, M.S. und Marcker, K.A.
 Nature 211, 380, (1966)
- Buchan, A. und Burke, D.C.
 Biochem. J. 94, 9P, (1965)
- Buchan, A. und Burke, D.C.
 Biochem. J. 98, 530, (1966)
- Buddecke, E.: Grundriss der Biochemie
 3. Aufl., Berlin 1973
- Burka, E.R. und Marks, P.A.
 L. Mol. Biol. 9, 439, (1964)

- Caskey, C.T., Beaudet, A. und Nirenberg, M.
J. Mol. Biol. 37, 99, (1968)
- Colombo, B., Felicetti, L. und Baglioni, C.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 18, 389, (1965)
- Coutsogeorgopoulos, C.
Biochim. Biophys. Acta 129, 214, (1966)
- Coutsogeorgopoulos, C.
Biochemistry 6, 1704, (1967)
- Creaser, E.H.
J. Gen. Microbiol. 12, 288, (1955)
- Dawson, K.G. und Beck, J.C.
Biochim. Biophys. Acta 107, 163, (1965)
- De Bary, .: Die Erscheinung der Symbiose
Straßburg 1879
- De la Haba, G. und Holtzer, H.
Science 149, 1263, (1965)
- Dickie, N., Alexander, C.S. und Nagasawa, H.T.
Biochim. Biophys. Acta 95, 156, (1965)
- Domagk, G.
Deutsche Med. Wchnschrift 61, 250, (1935)
- DuPraw, E.J.: DNA and Chromosomes
New York 1970
- Emmerich, R. und Löw, O.
Z. Hyg. Infekt.-Krankh. 31, 1, (1899)
- Fain, J.N.
Biochim. Biophys. Acta 84, 636, (1964)
- Farnham, A.E.
Virology 27, 73, (1965)
- Farnham, A.E. und Dubin, D.T.
J. Mol. Biol. 14, 55, (1965)
- Farnham, A.E. und Dubin, D.T.
Biochim. Biophys. Acta 138, 35, (1967)
- Felicetti, L., Tochini-Valentini, G.P. und DiMatteo, G.F.
Biochemistry 8, 3428, (1969)
- Fiegelson, E.B., Drake, J.W. und Recant, L.
J. Lab. Clin. Med. 50, 437, (1957)
- Fleming, A.
Brit. J. exp. Pathol. 10, 226, (1929)
- Flessel, C.P.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 32, 438, (1968)
- Flexner, L.B. und Flexner, J.B.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 55, 369, (1966)

- Flexner, J.B. und Flexner, L.B.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 57,1651, (1967)
- Flexner, L.B. und Flexner, J.B.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 60,923, (1968a)
- Flexner, L.B. und Flexner, J.B.
Science 159,330, (1968b)
- Flexner, J.B. und Flexner, L.B.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 62,729, (1969a)
- Flexner, J.B. und Flexner, L.B.
Science 165,1143, (1969b)
- Flexner, J.B. und Flexner, L.B.
Yale J.Biol.Med. 42,235, (1970)
- Flexner, J.B., Flexner, L.B., Stellar, E., de la Haba, G. und Roberts, R.B.
J.Neurochem. 9,595, (1962)
- Flexner, J.B., Flexner, L.B. und Stellar, E.
Science 141,57, (1963)
- Flexner, L.B., Flexner, J.B. und Stellar, E.
Expl.Neurol. 13,264, (1965a)
- Flexner, L.B., Flexner, J.B., de la Haba, G. und Roberts, R.B.
J.Neurochem. 12,535, (1965b)
- Flexner, L.B., Gambetti, P., Flexner, J.B. und Roberts, R.B.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 68,26, (1971)
- Florey, H.W., Chain, E., Gardner, A.D., Heatley, N.G., Jennings, M.A., Orr-Ewing, J. und Sandern, A.G.
Lancet 240,226, (1940)
- Franklin, T.J. und Godfrey, A.
Biochem.J. 98,513, (1966)
- Franklin, T.J. und Snom, G.A.: Biochemistry of Antimicrobial Action, 1.Aufl. London 1971
- Freedman, M.L., Fisher, J.M. und Rabinovitz, M.
J.Mol.Biol. 33,315, (1968)
- Frenk, S., Antonowicz, I., Craig, J.M. und Metcaff, J.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 89,424, (1955)
- Freudenreich, E.
Jahrb. Path.Microorg. 5,530, (1889)
- Gambetti, P., Gonatas, N.K. und Flexner, L.B.
Science 161,900, (1968)
- Gibbs, M.E. und Mark, R.F.: Inhibitors of Memory Formation
New York 1973
- Giegé, R., Kern, D. und Ebel, J.P.
Biochimie 54,1245, (1972)
- Giegé, R., Ebel, J.P., Springer, M. und Grunberg-Manago, M.
FEBS letters 37,166, (1973)
- Gilbert, W.
J.Mol.Biol. 6,389, (1963)

- Gottesman, M.E.
J.Biol.Chem. 242, 5564, (1967)
- Gourley, D.R.H. und Brunton, L.L.
Biochim.Biophys.Acta 184, 43, (1969)
- Grimmer, G.: Biochemie, Hochschultaschenbuch
Mannheim 1969
- Haenni, A. und Lucas-Lenard, J.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 61, 1363, (1968)
- Hardesty, B., Miller, R. und Schweet, R.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 50, 924, (1963)
- Harris, R.J., Hanlon, J.E. und Symons, R.H.
Biochim.Biophys.Acta. 240, 244, (1971)
- Haselkorn, R. und Rothman-Denes, L.B.: Protein Synthesis
in Ann.Rev.Biochem. 42, 397, (1973)
- Heintz, R.L., Salas, M.L. und Schweet, R.S.
Arch.Biochem.Biophys. 125, 488, (1968)
- Hershey, J.W.B. und Thach, R.E.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 57, 759, (1967)
- Hewitt, R.I., Gumble, A.R., Wallace, W.S. und Williams, J.H.
Antibiot.Chemotherapy 4, 1222, (1954)
- Hofert, J.F., Gorski, J., Mueller, G.C. und Boutwell, R.K.
Arch.Biochem.Biophys. 97, 134, (1962)
- Hofert, J.F. und Boutwell, R.K.
Arch.Biochem.Biophys. 103, 338, (1963)
- Holland, J.J.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 50, 436, (1963)
- Hori, M., Fisher, J.M. und rabinovitz, M.
Science 155, 83, (1967)
- Ishitsuka, H. und Kaji, A.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 66, 168, (1970)
- Jacobs-Lorena, M., Colombo, B. und Baglioni, C.
Biochim.Biophys.Acta 224, 174, (1970)
- John, D.W. und Miller, L.L.
J.Biol.Chem. 241, 4817, (1966)
- Joklik, W.K. und Becker, Y.
J.Mol.Biol. 13, 496, (1965)
- Kammen, H.O., Beloff, R.H. und Canellakis, E.S.
Biochim.Biophys.Acta 123, 39, (1966)
- Karlson, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie
7.Aufl., Thieme, Stuttgart 1970
- Kit, S., Dubbs, D.R. und Piekarski, L.J.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 11, 176, (1963)

- Kohler, R.E., Ron, R.Z. und Davis, B.D.
J.Mol.Biol. 36, 71, (1968)
- Kubota, K., Okuyama, A. und Tanaka, N.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 47, 1196, (1972)
- Lengyel, P. und Söll, D.
Bacteriol.Rev. 33, 264, (1969)
- Lewin, P.K. und Moscarello, M.A.
Lab.Invest. 19, 265, (1968)
- Lin, S., McKeehan, W.L., Culp, W. und Hardesty, B.
J.Biol.Chem. 224, 4340, (1969)
- Littlefield, J.W. und Jacobs, P.S.
Biochim.Biophys.Acta 108, 652, (1965)
- Livingston, D.M. und Leder, P.
Biochemistry 8, 435, (1969)
- Lucas-Lenard, J. und Haenni, A.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 59, 554, (1968)
- Lucas-Lenard, J. und Haenni, A.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 63, 93, (1969)
- Lucas-Lenard, J. und Lipmann, F.
Ann.Rev.Biochem. 40, 409, (1971)
- Maden, B.E.H., Traut, R.R. und Monro, R.E.
J.Mol.Biol. 35, 333, (1968)
- Maden, B.E.H. und Monro, R.E.
Eur.J.Biochem. 6, 309, (1968)
- Matthaei, H., Sander, G., Swan, D., Kreuzer, T., Caffier, H.
und Parmeggiani, A., Naturwissenschaften 55, 281, (1968)
- McKeehan, W.L. und Hardesty, B.
J.Biol.Chem. 244, 4330, (1969a)
- McKeehan, W.L. und Hardesty, B.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 36, 625, (1969b)
- McLaughlin, C.S. und Ingram, V.M.
Biochemistry 4, 1442, (1965a)
- McLaughlin, C.S. und Ingram, V.M.
Biochemistry 4, 1448, (1965b)
- Miskin, R., Zamir, A. und Elson, D.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 33, 551, (1968)
- Molnar, J., Robinson, G.B. und Winzler, R.J.
J.Biol.Chem. 239, 3157, (1964)
- Monro, R.E.
J.Mol.Biol. 26, 147, (1967)
- Monro, R.E. und Marcker, K.A.
J.Mol.Biol. 25, 347, (1967)
- Monro, R.E. und Vazquez, D.
J.Mol.Biol. 28, 161, (1967)

- Monro, R.E., Celma, M.L. und Vazquez, D.
Nature 222, 356, (1969a)
- Monro, R.E., Staehelin, T., Celma, M.L. und Vazquez, D.
Cold Spring Harbor Symposia 34, 357, (1969b)
- Montgomery, J.A. und Thomas, H.J.
Advan. Carbohydrate Chem. 17, 301, (1962)
- Moog, F.
Science 144, 414, (1964)
- Morris, A.J. und Schweet, R.S.
Biochim. Biophys. Acta 47, 415, (1961)
- Morris, A., Favelukes, S., Arlinghaus, R. und Schweet, R.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 7, 326, (1962)
- Morris, A., Arlinghaus, R., Favelukes, D. und Schweet, R.
Biochemistry 2, 1084, (1963)
- Mueller, G.C., Gorski, J. und Aizawa, Y.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 47, 164, (1961)
- Mueller, G.C., Kajiwar, K., Stubblefield, E. und Rueckert, R.R.
Cancer Research 22, 1084, (1962)
- Mukundan, M.A., Hershey, J.W.B., Dewey, K.F. und Thach, R.E.
Nature 217, 1013, (1968)
- Murata, K., Quilligan, J.J. und Morrison, L.M.
Biochim. Biophys. Acta 144, 473, (1967)
- Nakada, D.
Biochim. Biophys. Acta 103, 455, (1965)
- Nathans, D.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 51, 585, (1964)
- Nathans, D.,
J. Mol. Biol. 13, 521, (1965)
- Nathans, D.: "Puromycin" in: Antibiotics I, Mechanism of Action. Gottlieb, D. und Shaw, P.D., Eds., Springer, Berlin 1967, S. 259
- Nathans, D. und Lipmann, F.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 47, 497, (1961)
- Nathans, D. und Neidle, A.
Nature 197, 1076, (1963)
- Nathans, D., Allende, J.E., Conway, T.W., Spyrides, G.I. und Lipmann, F.: "Protein Synthesis from Aminoacyl-sRNA's" in: Symposium on Information Macromolecules; Vogel, H.J., Bryson, V. und Lampen, J.O., Eds, New York, Academic Press 1963
- Nemeth, A.M. und de la Haba, G.
J. Biol. Chem. 237, 1190, (1962)
- Neth, R., Monro, R.E., Heller, G., Battaner, E. und Vazquez, D.
FEBS letters 6, 198, (1970)
- Newton, A.A.
Biochem. J. 94, 9P, (1965)
- Nitowsky, H.M. und Herz, F.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 11, 261, (1963)

- Noll, H., Staehelin, T. und Wettstein, F.O.
Nature 198, 632 (1963)
- Noodén, L.D. und Thimann, K.V.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 50, 194, (1963)
- O'Brien, P.J., Canady, M.R., Hall, C.W. und Neufeld, E.F.
Biochim. Biophys. Acta 117, 331, (1966)
- Ochoa, S.
Naturwissenschaften, 55, 505, (1968)
- Ohta, T., Sarkar, S. und Thach, R.E.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 58, 1638, (1967)
- Pasteur, L.
Oeuvres de Pasteur, Paris 1922
- Pestka, S.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 64, 709, (1969)
- Pestha, S.
Arch. Biochem. Biophys. 136, 80, (1970a)
- Pestka, S.
Arch. Biochem. Biophys. 136, 89, (1970b)
- Pestka, S.
VII. International Congress of Chemotherapy, Prag 1971
- Pestka, S.
J. Biol. Chem. 247, 4669, (1972)
- Porter, J.N., Hewitt, R.I., Hesseltine, C.W., Krupka, G.,
Lowery, J.A., Wallace, W.S., Bohonos, N. und Williams, J.H.
Antibiot. Chemotherapy 2, 409, (1952)
- Raacke, I.D.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 2357, (1971)
- Rabinovitz, M. und Fisher, J.M.
J. Biol. Chem. 237, 477, (1962)
- Ravel, J.M., Shorey, R.L., Froehner, S. und Shive, W.
Arch. Biochem. Biophys. 125, 514, (1968)
- Reid, I.M., Shinozuka, H. und Sidransky, H.
Lab. Investigation 23, 119, (1970)
- Richter, D. und Klink, F.
Biochemistry 6, 3569, (1967)
- Ron, E.Z., Kohler, R.E. und Davis, B.D.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 56, 471, (1966)
- Rudland, P.S., Whybrow, W.A., Marcker, K.A. und Clark, B.F.C.
Nature 222, 750, (1969)
- Rudland, P.S. und Klemperer, H.G.
J. Mol. Biol. 61, 377, (1971)
- Sarkar, S. und Thach, R.E.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 60, 1479, (1968)

- Scharff, R. und Wool, I.G.
 Biochem.J. 97, 272, (1965)
- Shelton, K.R. und Clark, J.M., Jr.
 Biochemistry 6, 2735, (1967)
- Sherman, J.F., Taylor, D.J. und Bond, H.W.
 Antibiotics Ann. 2, 757, (1954/55)
- Sirlin, J.L., Jacob, J. und Tandler, C.J.
 Biochem.J. 87, 37P, (1963)
- Skogerson, L. und Moldave, K.
 J.Biol.Chem. 243, 5354, (1968)
- Smith, J.D., Traut, R.R., Blackburn, G.M. und Monro, R.E.
 J.Mol.Biol. 13, 617, (1965)
- Spyrides, G.J.
 Proc.Nat.Acad.Sci.USA 51, 1220, (1964)
- Studzinski, G.P., Woodruff, R.D. und Love, R.
 Fed.Proceed. 24, 239, (1965)
- Suhadolnik, R.J.: Nucleoside Antibiotics
 Wiley-Interscience, New York 1970
- Sundaralingam, M. und Arora, S.K.
 Proc.Nat.Acad.Sci.USA 64, 1021, (1969)
- Sundaralingam, M. und Arora, S.K.
 J.Mol.Biol. 71, 49, (1972)
- Swan, D., Sander, G., Bermek, E., Krämer, W., Kreutzer, T.,
 Arglebe, C., Zöllner, R., Eckert, K. und Matthaei, H. in
 Cold Spring Harbor Symposia, Vol. 34, S. 179
- Symons, R.H., Harris, R.J., Clarke, L.P., Wheldrake, J.F.
 und Elliott, W.H., Biochim.Biophys.Acta 179, 248, (1969)
- Szumski, S.A. und Goodman, J.J.
 U.S.Pat.No. 2,797,187 (1957)
- Takanami, M.
 Proc.Nat.Acad.Sci.USA 52, 1271, (1964)
- Takeda, Y., Hayashi, S., Nakagawa, H. und Suzuki, F.
 J.Biochem. 48, 169, (1960)
- Tamaoki, T. und Mueller, G.C.
 Biochem.Biophys.Res.Comm. 11, 404, (1963)
- Tanaka, S., Igarashi, K. und Kaji, A.
 J.Biol.Chem. 247, 45, (1972)
- Tanaka, K., Teraoka, H. und Tamaki, M.
 FEBS letters 13, 65, (1971)
- Taylor, J.M. und Stanners, C.P.
 Biochim.Biophys.Acta 155, 424, (1968)
- Traut, R.R. und Monro, R.E.
 J.Mol.Biol. 10, 63, (1964)
- Villa-Trevino, S., Farber, E., Staehelin, T., Wettstein, F.O.
 und Noll, H., J.Biol.Chem. 239, 3826, (1964)

- Vogel,Z.,Zamir,A. und Elson,D.
 Biochemistry 8,5161,(1969)
- Wagner,R.R. und Huang,A.S.
 Proc,Nat.Acad.Sci.USA 54,1112,(1965)
- Waksman,S.A. et al.
 Bact. Rev. 5,231,(1941)
- Waller,C.W.,Fryth,P.W.,Hutchings,B.L. und Williams,J.H.
 J.Am.Chem.Soc. 75,2025,(1953)
- Waller,J.P.,Erdös,T.,Lemoine,F.,Guttmann,S. und
 Sandrin, E., Biochim.Biophys.Acta 119,566,(1966)
- Warner,J.R. und Rich,A.
 Proc.Nat.Acad.Sci.USA 51,1134,(1964)
- Watson,J.D.
 Science 140,17,(1963)
- Watson,J.D.: Molecular Biology of the Gene,2.Aufl.
 Benjamin,Inc.,New York 1970
- Wehmer,C.: Beiträge zur Kenntnis einheimischer Pilze,
 Hannover u. Leipzig 1891,S.70
- Weissbach,H.,Miller,D.L. und Hachmann,J.
 Arch.Biochem.Biophys. 137,262,(1970)
- Wettstein,F.O. und Noll,H,
 J.Mol.Biol. 11,35,(1965)
- Wheelock,E.F.
 Proc.Nat.Acad.Sci.USA 48,1358,(1962)
- White,J.R. und White,H.L.
 Science 146,772,(1964)
- Williamson,A.R. und Schweet,R.
 J.Mol.Biol. 11,358,(1965)
- Wilson,S.G.F.,Hackel,D.B.,Horwood,S.,Nash,G. und
 Heymann,N., Pediatrics 21,963,(1958)
- Wolfenden,R.,Rammler,D.H. und Lipmann,F.
 Biochemistry 3,329,(1964)
- Yarmolinski,M.B. und de la Haba,G.L.
 Proc.Nat.Acad.Sci.USA 45,1721 (1959)
- Zamir,A.,Leder,P. und Elson,D.
 Proc.Nat.Acad.Sci.USA 56,1794,(1966)

LEBENS LAUF

Am 22. Oktober 1948 wurde ich, Stefan Frank, als erster von drei Söhnen des Facharztes für innere Krankheiten Dr. Herbert Frank und seiner Frau Gisela, geb. Menke, in Stuttgart geboren.

1955/56 besuchte ich die erste Klasse der Freien Waldorfschule in Stuttgart und anschließend drei Jahre die Volksschule in Stuttgart-Degerloch.

Ab 1959 besuchte ich bis zur Reifeprüfung im Juni 1967 das humanistische Karlsgymnasium in Stuttgart.

Im WS 1967/68 und SS 1968 studierte ich in Tübingen Biochemie und legte den 1. Teil des Vordiploms in Biochemie ab.

Im WS 1968/69 begann ich mit dem Medizinstudium in Stuttgart-Hohenheim und legte nach einem Semester den Rest des Vorphysikums ab (ein Semester und ein Teil der Prüfung wurden vom Biochemiestudium angerechnet).

Vom SS 1969 an studierte ich in Erlangen.

1970 legte ich die ärztliche Vorprüfung, im SS 1974 das medizinische Staatsexamen ab.

Von 1969 bis 1973 war ich im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Erlangen als studentische Hilfskraft beschäftigt, wo ich seit 1971 auch an der vorliegenden Dissertation arbeitete.



Buchdruckerei Ludwig Müller - 852 Erlangen, Fahrstraße 5